

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
Frankfurt am Main

Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dietger Jonas

**Modulation des Chemokin-Profiles beim Prostatakarzinom -  
Neue Ansätze in Diagnostik und Therapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von Ivaylo Nikolaev Raditchev  
Pazardzhik/Bulgarien

Frankfurt am Main, 2006

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent: Priv.- Doz. Dr. phil. nat. R. Blaheta

Korreferent: Prof. Dr. med. H. W. Doerr

Tag der mündlichen Prüfung: 05.Oktober 2006

meiner Frau und meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....                                   | <b>6</b>  |
| <b>1.1. Ziel der Arbeit</b> .....                            | <b>6</b>  |
| <b>1.2. Die Krebserkrankungen</b> .....                      | <b>6</b>  |
| <b>1.3. Die Prostata und das Prostatakarzinom</b> .....      | <b>6</b>  |
| 1.3.1. Die Prostata.....                                     | 6         |
| 1.3.2. Das Prostatakarzinom.....                             | 7         |
| 1.3.2.1. Epidemiologie.....                                  | 7         |
| 1.3.2.2. Risikofaktoren.....                                 | 8         |
| 1.3.2.3. Pathologie.....                                     | 8         |
| 1.3.2.4. Diagnostik.....                                     | 9         |
| 1.3.2.5. Therapiemöglichkeiten.....                          | 9         |
| <b>1.4. Die Tumorentstehung</b> .....                        | <b>11</b> |
| <b>1.5. Invasion und Metastasierung des Tumors</b> .....     | <b>12</b> |
| <b>1.6. Die Chemokin-Rezeptoren</b> .....                    | <b>13</b> |
| <b>1.7. Die löslichen Chemokine</b> .....                    | <b>14</b> |
| <b>1.8. Die Chemokine und der Prostataumor</b> .....         | <b>18</b> |
| <b>1.9. Fragestellung</b> .....                              | <b>18</b> |
| <br>   |           |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....                        | <b>19</b> |
| <b>2.1. Material</b> .....                                   | <b>19</b> |
| 2.1.1. Prostataprobe.....                                    | 19        |
| 2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....                       | 19        |
| 2.1.3. Verbrauchsgegenstände und Geräte.....                 | 22        |
| <b>2.2. Methoden</b> .....                                   | <b>23</b> |
| 2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der CXCR-Expression.....  | 23        |
| 2.2.1.1. Immunfluoreszenzmikroskopie.....                    | 24        |
| 2.2.1.2. Konfokale Laserscanmikroskopie.....                 | 24        |
| 2.2.1.2.1. Probenvorbereitung.....                           | 24        |
| 2.2.1.2.2. Färbung für Konfokale Laser-Scan Mikroskopie..... | 24        |
| 2.2.2. Analyse der CXCR- und CXCL-kodierenden mRNA.....      | 25        |
| 2.2.2.1. Einführung, Qualität und Quantität der RT-PCR.....  | 25        |
| 2.2.2.2. Präparation der Gewebeprobe.....                    | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.2.3. Aufarbeiten der Prostata-Proben.....  | 27        |
| 2.2.2.4. RNA-Isolierung.....   | 27        |
| 2.2.2.5. Die cDNA Synthese (Reverse Transkriptase-Reaktion).....   | 30        |
| 2.2.2.5.1. Einführung, Qualität und Quantität der Reverse Transkriptase-Reaktion.....                                    | 30        |
| 2.2.2.5.2. Ausführung der cDNA-Synthese.....   | 31        |
| 2.2.2.6. Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....   | 32        |
| 2.2.2.6.1. Einführung, Qualität und Quantität der PCR.....   | 32        |
| 2.2.2.6.2. Ausführung der PCR Reaktion.....  | 33        |
| 2.2.2.7. Gelelektrophorese und Dokumentation des Versuches.....  | 35        |
| 2.2.2.7.1. Auftrennung der cDNA-Synthese Erzeugnisse mittels Gelelektrophorese.....                                      | 35        |
| 2.2.2.7.2. Ausführung der Agarose-Gelelektrophorese.....   | 35        |
| 2.2.2.7.3. Darstellung der DNA-Fragmente mittels UV-Gerät.....   | 36        |
| 2.2.2.7.4. Erfassung der Gele.....   | 37        |
| 2.2.2.7.5. Auswertung des Versuches.....   | 37        |
| <b>2. 3. Statistik.....</b>  | <b>38</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.1. Einblick.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.2. Darstellung von Prostatatumorgewebe im pathologischen Schnellschnitt.....</b>                                    | <b>39</b> |
| <b>3.3. Analyse der Chemokin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Prostatatumorzelllinie LNCaP.....</b>                 | <b>41</b> |
| 3.3.1. Konfokale Laserscanmikroskopie.....   | 41        |
| <b>3.4. Quantitative Darstellung der CXCR-kodierenden mRNA in normalen und bösartigen Gewebeproben der Prostata.....</b> | <b>43</b> |
| <b>3.5. Quantitative Darstellung der CXCL-kodierenden mRNA in normalen und bösartigen Gewebeproben der Prostata.....</b> | <b>45</b> |
| <b>3.6. Analyse der Ergebnisse.....</b>  | <b>46</b> |
| 3.6.1. Statistische Auswertung der CXCR-Expression in normalen versus bösartigen Gewebeproben der Prostata.....          | 46        |
| 3.6.2. Statistische Auswertung der CXCL-Expression in normalen versus bösartigen Gewebeproben der Prostata.....          | 48        |
| 3.6.3. Betrachtung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Tumorstadiums.....  | 53        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.6.4. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf das histopathologische Grading (G) der Patienten.....    | 53         |
| 3.6.5. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf die Invasivität (T) des Prostata Tumors....              | 56         |
| 3.6.6. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf den Gleason-Score (GS) der Patienten...59                |            |
| <b>4. Diskussion.....</b>  | <b>63</b>  |
| <b>4.1. Überblick.....</b>   | <b>63</b>  |
| <b>4.1.1. Die Bedeutung der Chemokin-Rezeptoren bei Tumoren.....</b>                                       | <b>63</b>  |
| <b>4.1.2. Die Bedeutung der Chemokine bei Tumoren.....</b>   | <b>66</b>  |
| 4.1.2.1. Lösliche Chemokine und chemotaktische Zellen.....   | 66         |
| 4.1.2.2. Bedeutung der CXCL Chemokine bei der Transformation, dem Überleben und Wachstum eines Tumors..... | 67         |
| 4.1.2.3. Chemokine und die Modulation von Angiogenese und Angiostase.....                                  | 68         |
| 4.1.2.4. Chemokine und die Tumor-Leukozyten-Interaktion.....   | 69         |
| 4.1.2.5. Chemokine und die lokale Tumordinvasion.....  | 70         |
| 4.1.2.6. Chemokine und die Tumormetastasierung.....  | 70         |
| 4.1.2.7. Chemokine und die <i>in vivo</i> Extravasation.....   | 71         |
| <b>4.2. CXCR-Expression beim Prostatakarzinom.....</b>   | <b>71</b>  |
| 4.2.1. Der CXCR4-Rezeptor.....   | 72         |
| 4.2.2. Der CXCR5-Rezeptor.....   | 75         |
| <b>4.3. CXCL-Expression beim Prostatakarzinom.....</b>   | <b>76</b>  |
| 4.3.1. CXCL12-Veränderungen beim Prostatakarzinom.....   | 78         |
| 4.3.2. CXCL13-Veränderungen beim Prostatakarzinom.....   | 79         |
| <b>4.4. Ausblick.....</b>  | <b>82</b>  |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>   | <b>84</b>  |
| 5.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache.....   | 84         |
| 5.2. Summary.....  | 85         |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>86</b>  |
| <b>7. Anhang.....</b>  | <b>106</b> |
| 7.1. Verzeichnis der Abbildungen.....  | 106        |
| 7.2. Verzeichnis der Tabellen.....   | 108        |

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 7.3. Tabellen.....                 | 109        |
| 7.4. Abkürzungen.....              | 114        |
| <b>Danksagung.....</b>             | <b>117</b> |
| <b>Lebenslauf.....</b>             | <b>118</b> |
| <b>Schriftliche Erklärung.....</b> | <b>119</b> |

## **1. Einleitung**

### **1.1. Ziel der Arbeit**

Zahlreiche Studien postulieren einen Einfluss von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren auf die Malignität des Prostatakarzinoms (*Arya et al., 2004; Singh et al., 2004; Mochizuki et al., 2004; Sun et al., 2004; Wang et al., 2004*). Die Erstellung eines gesamten Chemokinprofils beim Prostataumor ist aber noch nicht erfolgt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Chemokinprofil im Prostatumorgewebe zu ermitteln und mit dem Expressionsmuster im Normalgewebe zu vergleichen. Mittels *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) und mikroskopischen Untersuchungen der Chemokinrezeptorexpression von Patientenmaterial sowie Tumorzellen wurden Daten ermittelt, die zur Darstellung und Verständnis der Chemokine beim Prostatakarzinom beitragen sollen.

### **1.2. Die Krebserkrankungen**

Die Krebserkrankungen umfassen alle Neubildungen bösartiger Genese einschließlich der primär systemischen Lymphome und Leukämien. Jährlich erkranken in Deutschland 161.000 Männer und 171.400 Frauen an Krebs (*Robert Koch Institut, Dachdokumentation Krebs, 2004*). Diese Angaben berücksichtigen nicht die nicht-melanotischen Hautkrebsformen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 66 und für Frauen bei 67 Jahren (*Arbeitsgemeinschaft Berufsbezogener Krebsregister in Deutschland, Robert Koch Institut, 2004*).

Im Jahre 2003 belief sich die Zahl der an Neubildungen Gestorbenen auf 214.788 (*Statistisches Bundesamt, 2005*). Trotz Optimierung der Tumorthherapie konnte die Überlebensrate der Krebspatienten in den letzten Jahren nicht hinreichend verbessert werden.

### **1.3. Die Prostata und das Prostatakarzinom**

#### **1.3.1. Die Prostata**

Die Prostata - auch Vorsteherdrüse genannt - ist ein kastaniengroßes Organ, das anatomisch unterhalb der Blase des Mannes liegt. Sie umschließt ringförmig die Harnröhre



des Mannes. Das normale Gewicht der Prostata beträgt 20 - 30 g. Aus embryologischer und funktioneller Sicht ist die Vorsteherdrüse in Zonen und Lappen unterteilt. Die zentrale Zone liegt periurethral und umschließt die Ductuli ejakulatorii (Böcker et al., 2001). Dieser innere Drüsenkern macht 30 % des Prostata Volumens aus. Die Prostata ist zusätzlich aus einem äußeren Drüsenmantel (70 % des Prostata Volumens) aufgebaut, der dorsal und lateral der zentralen Zone anliegt. Die so genannte Übergangzone befindet sich periurethral vom Blasen Hals bis zum Colliculus. Anatomisch unterteilt man die Prostata in einen linken, rechten und mittleren Lappen und Isthmus, der weitgehend frei von Drüsengewebe ist (Lippert et al., 1996). Testosteron ist das wichtigste Hormon für Wachstum und Funktion der Vorsteherdrüse. Das Enzym 5- $\alpha$ -Reduktase im Prostata Gewebe wandelt Testosteron in seinen aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron um. Die Prostata produziert ein Sekret, das zusammen mit der Samenflüssigkeit und den Samenzellen circa  $\frac{3}{4}$  der Samenflüssigkeit bildet. Die enge anatomische Nachbarschaft zum Mastdarm erlaubt das digitale rektale Abtasten der Drüse. Das stellt eine einfache und schnelle Untersuchung dar.

### **1.3.2. Das Prostatakarzinom**

#### **1.3.2.1. Epidemiologie**

Das Prostatakarzinom zählt zu den urologischen Tumoren des Mannes. Bösartige Veränderungen der Hoden, Nebenhoden, Blase, Niere, Nierenbecken und Ureter zählen ebenfalls zu dieser Tumorgruppe. Im Jahre 2003 starben 13.181 Personen an Neubildungen des Urogenitalsystems (Statistisches Bundesamt, 2005).

Krebs der Prostata war nach Lungen- und Darmkrebs im Jahr 2002 die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern (Krebsatlas des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg, 2004). Jährlich erkrankten mehr als 25.000 Männer an dieser Erkrankung. Insgesamt machen Erkrankungsfälle an Prostatakrebs etwa 14 % aller bösartigen Neubildungen beim Mann aus (Robert Koch Institut, Dachdokumentation Krebs, 2004). Im Jahre 2003 verstarben 11.150 männliche Patienten an bösartigen Neubildungen der Prostata. Das ergibt einen Anteil von 2,6 % aller Krebstodesfälle in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2005).

### 1.3.2.2. Risikofaktoren

Die Ursache für die Entstehung des Prostatakarzinoms ist noch unbekannt. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören jedoch das hohe Alter, familiäre Belastung und bestimmte Essgewohnheiten. Untersuchungen von Prostatachnitten 90-jähriger Patienten belegen eine Karzinomhäufigkeit von 70 - 100 % (*Böcker et al., 2001*). Es besteht zudem eine Verdoppelung des Erkrankungsrisikos bei Verwandten ersten Grades (*www.astazenecha.ch, 2005*). Auch verschiedene Menschenrassen haben unterschiedliche Erkrankungsrisiken. Afroamerikaner haben ein erhöhtes, Asiaten ein niedrigeres Risiko als Weiße, einen Prostatatumor zu entwickeln (*www.astrazeneca.ch, 2005*).

Ein erhöhter Verzehr von Fleisch und tierischen Fetten scheinen ebenfalls das Krankheitsrisiko zu erhöhen. Ein hoher Spiegel von Testosteron begünstigt das Tumorwachstum. Im Karzinomgewebe ist der Anteil von Androgenrezeptoren im Vergleich mit solchen in normaler Prostata höher (*Böcker et al., 2001*). Weitere Studien belegen eine protektive Funktion des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen.

### 1.3.2.3. Pathologie

Der Prostatakrebs ist ein Adenokarzinom, welches durch unkontrolliertes und zerstörendes Wachstum gekennzeichnet ist. Er entwickelt sich erstaunlicherweise immer in der peripheren, androgenabhängigen Zone. Danach wächst er in das Zentrum des Organs oder infiltriert die Nachbarorgane (Mastdarm, Samenblasen und Harnblase).

Histologisch unterscheidet man folgende Karzinom-Typen:

- hochdifferenziertes Adenokarzinom
- niedrigdifferenziertes Adenokarzinom
- kribriiformes Karzinom
- anaplastisches Karzinom
- pluriformes Karzinom

Alle diese Typen zeigen große Unterschiede hinsichtlich ihrem Wachstumsmuster und Malignität. Alle Krebszellen exprimieren prostataspezifische saure Phosphatase und das prostataspezifische Antigen PSA. Hochmaligne Karzinome exprimieren zusätzlich das *ras-p21*-Onkogen (*Böcker et al., 2001*).

Im Frühstadium bereitet der Prostatakrebs keine Beschwerden. Oft wird der Tumor bei Erektionsbeschwerden bemerkt. Im fortgeschrittenen Stadium sind Knochenschmerzen infolge von Metastasen typisch.

#### **1.3.2.4. Diagnostik**

Die frühzeitige Diagnose eines Tumors spielt eine wichtige Rolle für die Heilungschancen des Patienten. Je früher ein Karzinom entdeckt wird, desto höher ist die kurative Prognose. Zur Anwendung kommen Untersuchungen, die sich bei der Diagnostik des Prostatakrebses bewährt haben. Zu diesen Praktiken gehört die Bestimmung der Prostata-spezifischen Antigens (PSA). PSA ist eine Kallikrein-Serin-Protease, welche von der Prostata produziert wird. Ein kleiner Teil des Gesamt-PSA wird in das Blut sezerniert. Dieser Anteil ist messbar und kann als diagnostischer Parameter genutzt werden (*Yin et al., 2005*). Es ist dabei zu berücksichtigen, dass eine Erhöhung des PSA-Wertes sowohl durch gutartige Prostatahyperplasie, Prostatitis oder auch durch Krebs hervorgerufen wird. Als Grenzwert zählen PSA-Spiegel von 2,5 bis 4 ng/ml. Kleinere Abweichungen von diesen Referenzwerten weisen nicht notwendigerweise auf einen Tumor hin. Nur sehr hohe Werte  $> 10$  ng/ml, die über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen, sind tumorverdächtig und klärungsbedürftig. Eine schnelle Analyse beinhaltet die digitale rektale Untersuchung. Dabei wird die Beschaffenheit der Prostata mit dem Finger transrektal untersucht. Eine Verhärtung deutet auf einen Prostatakrebs hin. Es empfiehlt sich darüber hinaus die transrektale Stanzbiopsie mit anschließender pathologischer Begutachtung der Proben. Nach einer totalen Krebsbehandlung ist ein Anstieg des PSA ein entscheidendes Kriterium für erneutes Tumorwachstum.

#### **1.3.2.5. Therapiemöglichkeiten**

Die Therapiemöglichkeiten eines Prostatakarzinoms hängen von verschiedenen Faktoren ab. Eine erfolgreiche Therapie richtet sich nach dem Alter des Patienten, Tumorstadium, Karzinomaggressivität und weiteren Risikofaktoren. Bevor die Entscheidung für die Therapie fällt, muss klar festgelegt sein, ob der zu behandelnde Tumor nur auf das Organ begrenzt ist oder sich bereits Metastasen gebildet haben.

Wenn die Behandlung eines organbegrenzten Karzinoms vorgenommen werden soll, kommt die radikale Entfernung des Organs mittels Operation, Bestrahlung oder die abwartende Beobachtung der Tumorentwicklung (wait and see Strategie) in Betracht. Bei

einem fortgeschrittenen Tumor der Prostata, wobei eine Organüberschreitung oder Metastasen überwiegend in die Knochen festzustellen sind, schränkt sich die Therapie auf eine Hormonsubstitution oder eine palliative Entlastung des Patienten ein. Bei der radikalen Prostatektomie wird das gesamte Organ mit Teilen von Samenleiter und Samenbläschen entfernt. Es existieren drei Zugangswege bei der Operation - durch einen Bauchschnitt, durch die Dammregion oder durch eine Bauchspiegelung. Die Art des Eingriffs hängt von der Konstitution des Patienten und der Beschaffenheit des Tumors ab. Durch Beurteilung der intraoperativ gewonnenen Gewebeproben und Lymphknoten kann der Pathologe bessere Auskunft über Ausdehnung, Aggressivität und Stadium des Karzinoms erteilen. Bei vollständiger Entfernung eines organbegrenzten Tumors besteht eine hohe Heilungstendenz. Wenn der Tumor jedoch schon gestreut hat, sind die Heilungschancen äußerst limitiert. Grundsätzlich kann jedoch vor der Operation nicht beurteilt werden, ob der Tumor das Organ überschritten hat. Viele Patienten befürchten Komplikationen wie Inkontinenz und Erektionsstörungen. Diese Begleiterscheinungen schrecken viele Patienten vor einer adäquaten Therapie ab, was letztendlich zu einer eingeschränkten Patientencompliance führt.

Die zentrierte Applikation von Röntgenstrahlen ist eine weitere Behandlungsmöglichkeit. Diese Methode wird gut vertragen und kann ambulant durchgeführt werden. Jedoch sind als Nebeneffekt die strahlenbedingten Beschwerden und die hohe Erektionsstörungsrate, die meist später auftreten, zu erwähnen.

Bei der Spickung der Prostata - Brachytherapie - werden radioaktive Partikel in die Prostata angebracht. Derzeit werden zwei Methoden - Seeds und Afterloading - angewandt. Die Strahlung der radioaktiven Elemente hat eine krebstötende Wirkung. Die Verfahren sind neu etabliert, zur exakten Bewertung fehlen Langzeitergebnisse aus Patientenbehandlungen.

Eine Beobachtung der Tumorentwicklung (wait and see) empfiehlt sich nur bei Tumoren, die sich langsamer entwickeln. Viele Patienten haben ernste Vorerkrankungen, die frühzeitig zum Exitus (Tod) führen können. Da sich der allgemeine Zustand des Patienten durch eine Operation der Prostata weiter verschlechtern kann, sollen wenig aggressivere Tumore zurückhaltend behandelt werden.

Eine lindernde Behandlung erreicht man durch die Hormonsubstitution. Dabei wird durch Blockade oder Unterdrückung der Produktion von Testosteron ein verzögertes Wachstum des Tumors erreicht. Dies ist durch eine Orchiektomie (Entfernung des hormonbildenden Hodengewebes) oder medikamentös zu erzielen. Dabei kommen so genannte LHRH-Analoga oder Antiandrogene zum Einsatz. Die LHRH-Analoga

unterdrücken die Produktion der Sexualhormone über die Hirnanhangsdrüse, Antiandrogene supprimieren die Reaktionsfähigkeit von Testosteron an der Krebszelle.

In klinischer Erprobung befinden sich die interstitielle Hyperthermie mit äußerer Bestrahlung, der Einsatz von HIFU (Hoch-Intensivierter Fokussierter Ultraschall) und die Kryotherapie.

Nach gewisser Therapiedauer verliert die Hormonsubstitution ihre Wirkungskraft, es entwickelt sich unweigerlich ein hormonresistenter Prostatakrebs. In diesem Stadium verbleibt die Chemotherapie, Radiotherapie und/oder medikamentöse Behandlung als lebensverlängernde Maßnahme.

#### **1.4. Die Tumorentstehung**

Alle physiologisch intakten Zellen sind programmiert, auf Signale zu antworten, die den Wachstums- und Differenzierungsgrad beeinflussen (*Zlotnik, 2004*). Das Zellwachstum wird dabei über verschiedene Gene und intrazellulären Protein-Interaktionen kontrolliert. Eine Veränderung oder Schädigung der DNA führt zu neoplastischer Transformation der Zellen (*Hahn und Weinberg, 2002a*). Die Zellen charakterisieren sich dann durch eine unkontrollierte Teilung und eine expansive Ausbreitung. Es entsteht eine regionale Zunahme des Gewebevolumens, ein Prozess der als Tumorgenese bezeichnet wird. Die Tumorentstehung ist somit ein Resultat von Dysregulation des intrazellulären Gleichgewichts mit abnormer Zellproliferation und Differenzierungsgrad. Die Karzinogenese durchläuft die Stadien der Initiation, der Latenzzeit, der Promotion und der Progression. Die Faktoren wirken dabei prädisponierend für die Entartung.

Die Tumorerkrankungen werden in solche mit gutartiger oder bösartiger Genese unterteilt. Beide Tumorformen haben unterschiedliche morphologische Besonderheiten und eine typische Dignität. Die gutartigen Tumoren wachsen langsam und sind lokal gut begrenzt. Dagegen wachsen die bösartigen Tumoren infiltrierend, zerstörend und sind schlecht abgrenzbar. Die bösartigen Tumorzellen wandern durch den Organismus und bilden Tochterherde außerhalb des ursprünglichen Tumors. Diesen Prozess bezeichnet man als Metastasierung. Eine andere typische Eigenschaft aggressiver Tumortypen ist die Rezidivbildung. Dabei kann der Tumor nach chirurgischer Versorgung wieder auftreten.

Die beiden wichtigsten antagonistischen Systeme des Tumorwachstums sind die Onkogene (Protoonkogene) und die Tumorsuppressorgene. Die mutagenen Allele dieser Gene sind in verschieden Tumoren entdeckt worden und regulieren die Zellproliferation (*Hahn und*

Weinberg, 2002b). Die Protoonkogene (c-onc) haben eine wichtige Funktion bei der Regulierung und Differenzierung des Zellwachstums. Bei ihrer abwegigen Aktivierung wird die Tumorentstehung induziert. Als Beispiel für Onkogene sind *SIS*, *HST 1*, *INT 2*, *ERBB1 und 2*, *SRC*, *ABL*, *FOS*, *MYB*, die *ras*- und die *myc*-Familie zu nennen. Eine Störung in den Tumor-Suppressorgenen könnte die Entstehung eines Tumors begünstigen. Dazu gehören als Beispiel das Retinoblastomgen (*RB*) und das *TP53*-Gen. Die Tumorentstehung wird zudem von den Apoptosegenen, Telomerasegenen und von den DNA-Reparaturgenen beeinflusst. Außerdem sind bestimmte Viren, Strahlen und gewisse chemische Noxen in der Lage onkogen zu wirken.

### 1.5. Invasion und Metastasierung des Tumors

Die wichtigsten Eigenschaften der malignen Tumore sind invasives Wachstum und Metastasierung. Die Invasion findet durch das Eindringen in normales Gewebe mit nachfolgender lokaler Zerstörung der regionalen Zellstrukturen statt. Dabei werden die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst, die extrazelluläre Gewebematrix durch Enzyme degradiert und die aktive Bewegung der Tumorzellen (Lokomotion) ins Gewebe fortgesetzt.

Die Metastasierung erfolgt durch Absonderung der Tumorzellen von dem primären Tumor. Die Karzinomzellen sind in der Lage durch Lymphgefäße, kleine Blutgefäße oder über Flüssigkeit in Körperhöhlen in die größeren Zirkulationssysteme zu gelangen und durch den ganzen Organismus zu wandern. Dabei bilden sich Tochtergeschwulste (Metastasen) in bestimmten Organsystemen.

Die Metastasierung durchläuft verschiedene hintereinander geschaltete Schritte. Nur in ihrer kompletten Dynamik ist die Vollkommenheit der Tumorentwicklung und Ausbreitung gewährleistet (*Folkman, 1992, Woodhouse et al., 1997; Fidler, 1999; Chambers et al., 2001*).

Die Metastasenbildung verschiedener Tumore ist bezüglich der Zielorgane sehr variabel. Verantwortlich für ein spezifisches Metastasenmuster sind insbesondere auf der Membran der Tumorzellen exprimierte Oberflächenrezeptoren, die nur mit ihren spezifischen Liganden auf dem Endothel des Zielgewebes reagieren können. Typischerweise metastasiert der Prostatakrebs über seine Liganden bevorzugt in den Knochen (*Chambers et al., 2002*). Die Beurteilung des klinischen Verhaltens und des Differenzierungsgrades eines Tumors hat eine enorme Bedeutung für die Heilung des Patienten. In späteren Tumorstadien findet man fast im ganzen Körper Metastasen. In diesem Falle ist die Prognose für die Patienten sehr ungünstig, die Behandlungsmöglichkeiten sehr eingeschränkt. Um die therapeutischen

Ansätze und die Perspektiven für die Patienten signifikant zu erhöhen, ist es entscheidend, frühzeitig das Metastasepotential des Prostatakarzinoms zu analysieren und die Aggressivität des Tumors zu bestimmen. Viele Arbeiten verweisen diesbezüglich auf die Gruppe der Chemokine und ihrer Rezeptoren. Es wird postuliert, dass die Darstellung der Chemokin-Liganden-Interaktion im Tumor als neue prognostische und klinisch relevante Parameter anzusehen sind, die Verlauf und Aggressivität des Karzinoms widerspiegeln und somit eine optimierte Behandlung des Patienten einleiten könnten.

## 1.6. Die Chemokin-Rezeptoren

Die Chemokin-Rezeptoren zählen zur Subfamilie der 7-Transmembran-Domäne-Rezeptoren. Die biologischen Effekte der Chemokine werden durch diese membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die auf Chromosom 2 und 3 lokalisiert sind, vermittelt (*Zlotnik und Yoshie, 2000*). Die N-terminale Sequenz des Chemokin-Rezeptors befindet sich extrazellulär, der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert. Ihr Proteinanteil in Form von  $\alpha$ -Helices schlängelt sich siebenmal durch die Membran der Zelle. Am C-Ende befindet sich ein Serin- und Threonin-reicher Abschnitt, der nach einer Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert wird (*Balkwill, 1998*).

Die Kennzeichnung der Chemokin-Rezeptoren erfolgt systematisch nach der Chemokin-Nomenklatur. Nach der Reihenfolge der Liganden werden die Rezeptoren mit fortlaufenden Nummern versehen. Die Rezeptoren sind in CXCR1 bis 6, CCR1 bis 11, CX3CR1 und XCR1 unterteilt. Die Ligand-Rezeptor-Interaktion ist charakterisiert durch eine große Redundanz und eine hohe Spezifität der Rezeptoren mit den jeweiligen Liganden. Im Vergleich binden die Rezeptoren CXCR1 bis CXCR3, CCR1 bis CCR5, CCR8, CCR10 und XCR1 an mehrere Chemokine. Dagegen agieren die sechs Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR6, CCR9 und CX3CR1 mit nur einem Liganden (*Balkwill, 2004*).

Das Profil der Chemokin-Rezeptor-Expression der Zelle hängt von ihrer Art und Differenzierungsgrad, von der Präsenz von inflammatorischen Chemokinen und Hypoxie ab.

Die Chemokin-Rezeptoren werden von Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen exprimiert (*Baggiolini, 2001*). Auch Tumorzellen können ein begrenztes und spezifisches Muster von Chemokin-Rezeptoren exprimieren. So kann die Metastasierung des Tumors durch die Antwort auf den Chemokin-Gradienten beeinflusst werden. Sie modulieren die gezielte Migration der Tumorzellen (*Zlotnik, 2004*).

Der meist gefundene Rezeptor ist CXCR4. Zusammen mit CCR7 ist er der Schlüsselrezeptor bei der Metastasenbildung von vielen Tumoren. CXCR4 ist bedeutsam für die Metastasierung in Lunge, Leber, Knochenmark und womöglich Gehirn. Er ist in Ovarialkarzinomen, lymphoblastischer Leukämie, Prostatakarzinomen, im Glioblastom, Pankreaskarzinom, Neuroblastom, Nierenkarzinom, Non-Hodgkin Lymphom, Rhabdomyosarkom und Lungenkarzinom exprimiert (Zlotnik, 2004). Im Vergleich ist CCR7 für die Metastasierung in Lymphknoten bekannt.

Insgesamt lässt sich ableiten, dass die Chemokine bzw. Chemokin-Rezeptor-Interaktion eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis, Adhäsion, Invasion, Proliferation und Malignität der Tumorzellen spielen.

Aktuelle Publikationen verweisen auf die Expression der Chemokin-Rezeptoren bei verschiedenen Karzinomen, beispielsweise beim Magenkarzinom (Kwak *et al.*, 2005), Kolorektalkarzinom (Kim *et al.*, 2005), Bronchialkarzinom (Phillips *et al.*, 2005), Blasenkarzinom (Eisenhardt *et al.*, 2005), Brustdrüsenkarzinom (Helbig *et al.*, 2003) sowie Schilddrüsenkarzinom (Hwang *et al.*, 2003).

## 1.7. Die löslichen Chemokine

Der Begriff Chemokine wurde im Jahre 1992 zum ersten Mal verwendet und ist eine Abkürzung für chemotaktische Cytokine. Insgesamt umfasst der Begriff eine große Familie von Proteinen mit chemotaktischer Aktivität (Balkwill, 2004). Ihre Wirkung in der Zelle entfaltet sich durch die Korrespondenz mit G-Protein-gekoppelten membranständigen Rezeptoren (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Neben chemotaktischen Vorgängen sind Chemokine auch an der Reifung von dendritischen Zellen (Sozanni *et al.*, 1998), der Entwicklung von B- (Forster *et al.*, 1994) und T-Lymphozyten (Vicari *et al.*, 1997) beteiligt. Sie können auch die T2-Helfer-Zellen Polarisation vermitteln (Gu *et al.*, 2000).

Die Chemokine sind kleine Proteine mit einem Gewicht von 8 - 10 kDa. Strukturell werden die Chemokine nach der Position der ersten beiden Cysteinreste (C) zum N-terminalen Ende in vier Subgruppen unterteilt: CXC, CC, C und CX<sub>3</sub>C (Balkwill, 2004). Bei den CXC oder  $\alpha$ -Chemokinen ist eine Aminosäure (mit X bezeichnet) zwischen den Cysteinresten eingebunden. Bei den CC oder  $\beta$ -Chemokinen liegen die Cystein-Reste benachbart. Bei der dritten Gruppe, C oder  $\gamma$ -Chemokine, fehlen das erste und das dritte von den vier Cysteinresten. Bei der vierten Gruppe, CX<sub>3</sub>C oder  $\delta$ -Chemokine, befinden sich drei



Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinresten (*Baggioni, 1998; Rollins, 1997, Murphy et al., 2002*). Die CX<sub>3</sub>C Chemokine werden alternativ Fraktalkine oder Neurotaktine genannt (*Baggioni, 2001*). Eine neue Gruppe von Chemokinen ist durch das Lymphotactin vertreten, das nur zwei konservierte Cysteinreste aufweist (*Kelner et al., 1994*).

Gentechnisch sind fast alle Chemokine erfasst. Zum Beispiel sind CXC Chemokine, die mit Neutrophilen agieren, auf Chromosom 4q12-13 und CC Chemokine, die mit Monozyten operieren, auf Chromosom 17q11.2 kodiert (*Zlotnik und Yoshie, 2000*).

Im Jahre 2000 wurde von *Zlotnik und Yoshie* eine neue Klassifikation der Chemokine und der Chemokin-Rezeptoren veröffentlicht, die unten in **Tabelle 1** dargestellt ist. Neue Studien belegen die Existenz von mehr als 50 Chemokinen und 18 Chemokin-Rezeptoren (*Balkwill, 2004*).

**Tabelle 1:** Die CXC, C und CX<sub>3</sub>C Chemokin-Rezeptor Familie. Mit „?“ sind die Maus Homologe aufgelistet, die nicht unbedingt dem humanen Liganden entsprechen. In Klammern sind die systemischen Namen aufgeführt, die noch nicht identifiziert worden sind. Verändert aus *Zlotnik und Yoshie, 2000*.

| Systemischer Name                                | Humanes Chromosom | Humanes Ligand                         | Maus Ligand    | Chemokine Rezeptor  |
|--|-------------------|--|----------------|---------------------|
| <b>CXC Chemokin-Rezeptor Familie</b>             |                   |  |                |                     |
| CXCL1  | 4q12-q            | 13GRO $\alpha$ /MGSA- $\alpha$         | GRO/KC?        | CXCR2 > CXCR1       |
| CXCL2  | 4q12-q13          | GRO $\beta$ /MGSA- $\beta$             | GRO/KC?        | CXCR2               |
| CXCL3  | 4q12-q13          | GRO $\gamma$ /MGSA- $\gamma$           | GRO/KC?        | CXCR2               |
| CXCL4  | 4q12-q13          | PF4                                    | PF4            | Unknown             |
| CXCL5  | 4q12-q13          | ENA-78                                 | LIX?           | CXCR2               |
| CXCL6  | 4q12-q13          | GCP-2                                  | CK $\alpha$ -3 | CXCR1, CXCR2        |
| CXCL7  | 4q12-q13          | NAP-2                                  | Unknown        | CXCR2               |
| CXCL8  | 4q12-q13          | IL-8                                   | Unknown        | CXCR1, CXCR2        |
| CXCL9  | 4q21.21           | Mig                                    | Mig            | CXCR3               |
| CXCL10   | 4q21.21           | IP-10                                  | IP-10          | CXCR3               |
| CXCL11   | 4q21.21           | I-TAC                                  | Unknown        | CXCR3               |
| CXCL12   | 10q11.1           | SDF-1 $\alpha$ / $\beta$               | SDF-1          | CXCR4               |
| CXCL13   | 4q21              | BLC/BCA-1                              | BLC/BCA-1      | CXCR5               |
| CXCL14   | Unknown           | BRAK/bolekine                          | BRAK           | Unknown             |
| (CXCL15)   | Unknown           | Unknown                                | Lungkine       | Unknown             |
| <b>C Chemokin-Rezeptor Familie</b>               |                   |  |                |                     |
| XCL1   | 1q23              | Lymphotactin/<br>SCM-1 $\alpha$ / ATAC | Lymphotactin   | XCR1                |
| XCL2   | 1q23              | SCM-1 $\beta$                          | Unknown        | XCR1                |
| <b>CX<sub>3</sub>C Chemokin-Rezeptor Familie</b> |                   |  |                |                     |
| CX <sub>3</sub> CL1                              | 16q13             | Fractalkine                            | Neurotactin    | CX <sub>3</sub> CR1 |
| <b>CC Chemokin-Rezeptor Familie</b>              |                   |  |                |                     |
| CCL1   | 17q11.2           | I-309                                  | TCA-3, P500    | CCR8                |

|           |          |                                   |                                  |                  |
|-----------|----------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| CCL2      | 17q11.2  | MCP-1/MCAF                        | JE?                              | CCR2             |
| CCL3      | 17q11.2  | MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$     | MIP-1 $\alpha$                   | CCR1, CCR5       |
| CCL4      | 17q11.2  | MIP-1 $\beta$                     | MIP-1 $\beta$                    | CCR5             |
| CCL5      | 17q11.2  | RANTES                            | RANTES                           | CCR1, CCR3, CCR5 |
| (CCL6)    |          | Unknown                           | C10, MRP-1                       | Unknown          |
| CCL7      | 17q11.2  | MCP-3                             | MARC?                            | CCR1, CCR2, CCR3 |
| CCL8      | 17q11.2  | MCP-2                             | MCP-2?                           | CCR3             |
| (CCL9/10) | Unknown  | MRP-2, CCF18                      | MIP-1 $\gamma$                   | Unknown          |
| CCL11     | 17q11.2  | Eotaxin                           | Eotaxin                          | CCR3             |
| (CCL12)   |          | Unknown                           | MCP-5                            | CCR2             |
| CCL13     | 17q11.2  | MCP-4                             | Unknown                          | CCR2, CCR3       |
| CCL14     | 17q11.2  | HCC-1                             | Unknown                          | CCR1             |
| CCL15     | 17q11.2  | HCC-2/Lkn-1/MIP-1 $\delta$        | Unknown                          | CCR1, CCR3       |
| CCL16     | 17q11.2  | HCC-4/LEC                         | LCC-1                            | CCR1             |
| CCL17     | 16q13    | TARC                              | TARC                             | CCR4             |
| CCL18     | 17q11.2  | DC-CK1/PARC                       | Unknown                          | Unknown          |
|           |          | AMAC-1                            |                                  |                  |
| CCL19     | 9p13     | MIP-3 $\beta$ /ELC/<br>exodus-3   | MIP-3 $\beta$ /ELC<br>exodus-3   | CCR7             |
| CCL20     | 2q33-q37 | MIP-3 $\alpha$ /LARC/<br>exodus-1 | MIP-3 $\alpha$ /LARC<br>exodus-1 | CCR6             |
| CCL21     | 9p13     | 6Ckine/SLC/<br>exodus-2           | 6Ckine/SLC/<br>exodus-2/TCA-4    | CCR7             |
| CCL22     | 16q13    | MDC/STCP-1                        | ABCD-1                           | CCR4             |
| CCL23     | 17q11.2  | MPIF-1                            | Unknown                          | CCR1             |
| CCL24     | 7q11.23  | MPIF-2/Eotaxin-2                  | Unknown                          | CCR3             |
| CCL25     | 19p13.2  | TECK                              | TECK                             | CCR9             |
| CCL26     | 7q11.23  | Eotaxin-3                         | Unknown                          | CCR3             |
| CCL27     | 9p13     | CTACK/ILC                         | ALP/CTACK<br>ILC<br>ESkine       | CCR10            |

Die Familie der löslichen CXCL Chemokine wird in Glu-Leu-Arg (ELR<sup>+</sup>)- und (ELR<sup>-</sup>)-Chemokinen gegliedert. Diese Unterteilung basiert auf der An- oder Abwesenheit der charakteristischen Tripeptidsequenz ELR an dem N-terminalen Ende vor dem ersten Cysteinrest (*Mukaida, 2003*).

Die ELR<sup>+</sup>-CXC Chemokine sind potente Angiogenese-Faktoren und können die Migration von Endothelzellen steuern. Die ELR<sup>-</sup>-CXC Chemokine sind starke Angiostase-Faktoren und hemmen die Migration der Endothelzellen (*Strieter et al., 1995*). ELR<sup>+</sup>-CXCL Chemokine binden an CXCR1 und CXCR2. ELR<sup>-</sup>-CXCL Chemokine binden an CXCR3, CXCR4, CXCR5 (*Zlotnik und Rossi, 2000*).

Chemokine spielen neben der Gruppe der Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle bei den Entzündungsprozessen durch Aktivierung spezifischer Leukozyten-Subpopulationen. Dabei wirken sie als Signalmoleküle im Rahmen der Koordination der Chemotaxis. Sie können eine direkte Migration von Leukozyten bewirken. Die gerichtete

Zellmigration findet entlang des Chemokingradienten statt. Die Zellen bewegen sich dabei in Richtung der höheren Chemokin-Konzentration (*Balkwill, 2004*).

Die Intergrin-vermittelte Adhäsion an Endothelgefäßzellen nimmt eine wichtige Rolle bei der Diapedese von Leukozyten ein (*Piali, 1998*). Chemokine können Neutrophile stimulieren und eine schnelle Veränderung der Gestalt der Zelle durch Polymerisation oder Depolymerisation von Aktin bewirken. Dabei erfolgt eine Überproduktion und Aktivierung von Integrinen, durch die die Leukozyten an den Endothelzellen haften, bevor sie zu wandern beginnen (*Baggioni, 2001*). Endothelzellen wiederum exprimieren Chemokine, die wichtig für die Aktivierung von Neutrophilen bei inflammatorischen Prozessen sind (*Imaizumi et al., 2004*).

Mittlerweile ist bekannt, dass Chemokine auch die Tumorzelladhäsion an das Endothel vermitteln. Die chemotaktisch-regulierte Extravasation hat insbesondere eine bedeutende Rolle bei der Fernmetastasierung der Tumorzellen (*Gassmann, 2004*).

Verschiedene Tumorgewebe zeichnen sich durch ein komplexes Chemokin-Netzwerk aus, das Ausdehnung und Phänotyp des Infiltrats prädestinieren und einen Einfluss auf das Wachstum, Überleben und die Migration der Tumorzellen sowie auf Angiogeneseprozesse ausübt (*Balkwill, 2003*). Es verbleibt anzumerken, dass Tumore nicht nur aus Tumorzellen bestehen, sondern auch aus nicht malignen Zellen. In Tumoren wurden Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Eosinophile, Granulozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten nachgewiesen. Sowohl Immunzellen und die Endothelzellen, als auch die Tumorzellen exprimieren Chemokin-Rezeptoren und reagieren auf den Chemokin-Gradienten (*Muller et al., 2001; Murphy, 2001*). Die Chemokine sind somit Schlüsseldeterminanten für die Makrophagen- und Lymphozyten-Infiltration in Tumorgewebe. Das trifft zum Beispiel für Infiltrate von Brustkrebs, Cervix-, Pankreaskarzinom sowie Sarkomen und Gliomen zu (*Balkwill und Mantovanni, 2001; Botazzi et al, 1983*).

Grundsätzlich besteht eine Assoziation zwischen der Chemokin-Expression und der Progression und der Aggressivität des Tumors (*Saji et al., 2001; Luboshits et al., 1999*). Eine Expression von Chemokinen zeigt sich dabei bei Tumorzellen verschiedener Karzinomarten, beispielsweise bei Pankreaskarzinom (*Hedin, 2002*), bei Lungenkarzinom (*Keshamouni et al., 2005*) bei Blasenkarzinom (*Yamada et al., 2005*), in Ovarialkarzinom (*Li et al., 2005*), bei Magenkarzinom (*Leung et al., 2004*), bei Kolorektalkarzinom (*Hu et al., 2002*).

## 1.8. Die Chemokine und der Prostata tumor

Es wird postuliert, dass sich der Prostata tumor über ein komplexes Chemokin-Profil charakterisiert, das unmittelbar Infiltration und Migration des Tumors, sein Wachstum und Überleben reguliert, aber auch Angiogenese-Phänomene steuert (*Balkwill, 2004*). Die spezifische Migration der Tumorzellen ist demnach von ihrer eigenen Chemokinrezeptor-Expression, als auch der Expression der Chemokine des Zielorgans abhängig (*Zlotnik und Rossi, 2000*). In diesem Sinne besteht eine enge Wechselbeziehung zwischen löslichen Chemokinen, ihrer Anbindung an spezifische Chemokin-Rezeptoren und der Entwicklung bzw. Progression des Prostata tumors. Nur wenige Arbeiten berichten jedoch über die Bedeutsamkeit der Chemokin-Expression bei diesem Tumor. Eine Wechselwirkung zwischen CXCL12 und CXCR4 wird direkt mit der metastastatischen Aktivität des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht (*Mochizuki et al., 2004*). Womöglich reguliert CXCR4 die Metastasierung in Knochen (*Taichmann et al., 2002*).

Arya und Mitarbeiter postulieren, dass der CXCL12/CXCR4-Komplex die organspezifische Metastasenbildung des Prostatakarzinoms determiniert (*Arya et al., 2004*). Eine aktuelle Publikation von Engl et al. (*2005*) präsentiert die Korrelation zwischen dem CXC Chemokinprofil und der zellulären Adhäsion von DU 145, LNaCP und PC3 Prostata tumorzelllinien an Endothel und extrazellulärer Matrix. Generell sind jedoch Informationen über die Rolle der Chemokine und deren Rezeptoren beim Prostata tumor spärlich. Datenmaterial, welches detailliert das Chemokinmuster und die Aufgabe der dazugehörigen Rezeptoren im Prostata tumorgewebe darstellt, ist nicht vorhanden.

## 1.9. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Thesen formuliert:

- Ein bestimmtes Muster von Chemokinen wird von Prostata tumorzellen exprimiert
- Veränderungen des Chemokin-Profiles korrelieren mit verschiedenen Malignitätsstadien des Prostatakarzinoms

Nach den oben genannten Thesen sollte ein Chemokin-Profilmuster herausgearbeitet und analysiert werden. Die Abhängigkeit vom Stadium der Tumorentwicklung wurde dabei berücksichtigt. Die Evaluation erfolgte mittels *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) und mikroskopischen Untersuchungen an Patientengewebe sowie isolierten Zellkulturen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Prostataprobe

Die verwendeten Probensubstanzen bestanden aus humanen Gewebeproben. Die Gewebeproben wurden aus nativen OP-Präparaten der Prostata im Zentrum der Urologie und Kinderurologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität gewonnen. Die pathologische Begutachtung erfolgte im Zentrum der Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Insgesamt wurden Proben von 50 Patienten untersucht. Bei jedem Patienten wurden jeweils eine Probe aus gesundem und eine Probe aus makroskopisch tumorverdächtigem Gewebe der Prostata, mit freundlicher Unterstützung der Pathologie der Universitätsklinik, präpariert. Somit konnten 100 Gewebeproben in dieser Studie erfasst werden.

Die Gewinnung der Proben aus normalem und tumorverdächtigem Gewebe desselben Prostata-Präparates, gewährleistete eine Gegenüberstellung der untersuchten Chemokin-Expression zwischen gesundem und karzinogenem Gewebe. Die komplexen Angaben der einzelnen Gewebeproben, Informationen über Tumorstadium, TNM-Stadium und Patientendaten sind im Anhang, in Form von **Tabelle 2**, dargestellt.

#### 2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

##### 2.1.2.1. Chemikalien für die Gewebevorbereitung

- Flüssiger Stickstoff zum Schockfrieren Fa. Messer, Griesheim

##### 2.1.2.2. Chemikalien für die RNA Isolierung:

- Mercaptoethanol Merck, Darmstadt
- Ethanol 70 % Merck, Darmstadt
- QIAshredder (Cat.No.79656) Fa. Qiagen, USA

Zur RNA Isolierung wurde das Rneasy Mini Kit (250; Cat.No.74 106) der Fa. Qiagen, USA verwendet.

Das Kit enthält folgende Komponente:

- Rneasy mini spin Säulen (pink)
- Collection tubes (1,5 ml)
- Collection tubes (2 ml)

- RLT Puffer
- RW1 Puffer
- RPE Puffer (als Konzentrat geliefert, mit Ethanol 96 - 100 %, vor Gebrauch zu verdünnen)
- Rnase freies Wasser

#### 2.1.2.3. Chemikalien für den DNAase-Verdau:

Für den Schritt des DNAase-Verdau wurde der RNase-free DNase Set (50, Cat. No 79254) der Fa. Qiagen, USA angewandt.

Das Set beinhaltet:

- DNase I, RNase frei, (lyophilisiert)
- RDD Puffer
- RNase freies Wasser

#### 2.1.2.4. Chemikalien für die Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA-Synthese):

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| • <u>5facher Erststrangpuffer:</u><br>250 mM Tris HCl<br>375 mM KCl<br>15 mM Mg Cl <sub>2</sub><br>pH 8,3 | Gibco BRL/ Invitrogen, Karlsruhe |
| • Superscript II RT Reverse Transkriptase<br>(200 U/μl)   | Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe  |
| • p(DT) <sub>15</sub> Oligonukleotid Primer<br>(0,5 μg/μl )   | Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe  |
| • dNTP Mix (10 mM pro Nukleotidtyp)   | Gibco BRL/ Invitrogen, Karlsruhe |
| • Dithiothreitol (DTT) 0,1 M  | Gibco BRL/ Invitrogen, Karlsruhe |

#### 2.1.2.5. Chemikalien für die Polymerase-Ketten-Reaktion:

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| • Platinum <i>Taq</i> - Polymerase (Cat.No.:10966-026) | Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe |
| • Mg Cl <sub>2</sub> (50 mM)                           | Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe |
| • Aqua dest.   | Braun AG, Melsungen             |
| • Verwendete Oligonukleotide                           | MWG-Biotech AG, Ebersberg       |

Die Sequenzen der gebrauchten Oligonukleotiden (Primer) zwecks Amplifikation sind unten in **Tabelle 3** aufgeführt:

**Tabelle 3:** Sequenzen der verwendeten Oligonukleotiden (Primer)

| Primer          | Primer-Sequenz                      |
|-----------------|-------------------------------------|
| CXCL 1 reverse  | 5` - TCA CGT TCA CAC TTT GCA TG-3`  |
| CXCL 1 forward  | 5` - CTG TTC CGC TCC TCT CAC AG-3`  |
| CXCL 2 reverse  | 5` - TCA AAC ACA TTA GGC GCA AG-3`  |
| CXCL 2 forward  | 5` - CTC AAG AAT GGG CAG AAA GC-3`  |
| CXCL 4 reverse  | 5` - GTC CGG CCT TGA TCA CCT -3`    |
| CXCL 4 forward  | 5` - GCG CTG AAG CTG AAG AAG AT-3`  |
| CXCL 5 reverse  | 5` - CAG TGA TTC CTG GCT CAC AC-3`  |
| CXCL 5 forward  | 5` - ACC CAG GGA AGA CAA GAA GG-3`  |
| CXCL 8 reverse  | 5` - AAA CCA AGG CAC AGT GGA AC-3`  |
| CXCL 8 forward  | 5` - CAG GAA TTG AAT GGG TTT GC-3`  |
| CXCL 9 reverse  | 5` - CTA ACC GAC TTG GCT G CT TC-3` |
| CXCL 9 forward  | 5` - CCA CCG AGA TCC TTA TCG AA-3`  |
| CXCL 10 reverse | 5` - AGC AGG GTC AGA ACA TCC AC-3`  |
| CXCL 10 forward | 5` - AAG GAT GGA CCA CAC AGA GG-3`  |
| CXCL 12 reverse | 5` - GGA CAC ACC ACA GCA CAA AC-3`  |
| CXCL 12 forward | 5` - CTA GTC AAG TGC GTC CAC GA-3`  |
| CXCL 13 reverse | 5` - TGA GGG TCC ACA CAC ACA AT-3`  |
| CXCL 13 forward | 5` - CTG TGC TTC TCA TGC TGC AC-3`  |
| GAPDH reverse   | 5` - ACC ACT GAC ACG TTG GCA GT-3`  |
| GAPDH forward   | 5` - ATC TTC CAG GAG CGA GAT CC-3`  |
| CXCR1 reverse   | 5` - AGT GTA CGC AGG GTG AAT CC -3` |
| CXCR1 forward   | 5` - TTT GTT TGT CTT GGC TGC TG -3` |
| CXCR2 reverse   | 5` - TGA GGA CGA CAG CAA AGA TG -3` |
| CXCR2 forward   | 5` - ACA TGG GCA ACA ATA CAG CA -3` |
| CXCR3 reverse   | 5` - GTT CAG GTA GCG GTC AAA GC -3` |
| CXCR3 forward   | 5` - ACA CCT TCC TGC TCC ACC TA -3` |
| CXCR4 reverse   | 5` - TGG AGT GTG ACA GCT TGG AG -3` |
| CXCR4 forward   | 5` - GGT GGT CTA TGT TGG CGT CT -3` |
| CXCR5 reverse   | 5` - ATG CGT TTC TGC TTG GTT CT -3` |
| CXCR5 forward   | 5` - GGT CTT CAT CTT GCC CTT TG -3` |
| CXCR6 reverse   | 5` - AGG TGA GGA TGA GCA TGG AC -3` |
| CXCR6 forward   | 5` - CTG GTG GTG TTT GTC TGT GG -3` |

- 10-faches PCR R<sub>xn</sub> Puffer (ohne Mg) Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe  
250 mM Tris HCl  
500 mM KCl  
pH 8,4

#### 2.1.2.6. Reagenzien für die Elektrophorese:

- Agarose, Seakem® LE (Cat. No.:50004) Fa.Cambrex, USA
- 5-faches TBE Puffer:
 

|                |          |                                 |
|----------------|----------|---------------------------------|
| Tris Ultrapure | 302,75 g | Appli Chem, Darmstadt           |
| Borsäure       | 139,0 g  | Merck, Germany                  |
| EDTA 0,5 M     | 9,25 g   | Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe |

 auf 5000 ml Aqua dest. auffüllen, pH 8
- 10-faches Blue Juice™ Gel Loading Puffer Fa. Invitrogen, USA
 

|                         |
|-------------------------|
| 65 % (w/v) Sucrose      |
| 10 mM Tris HCl (pH 7,5) |
| 10 mM EDTA              |
| 0,3 % (w/v) Bromophenol |
- Basenpaarleiter
 

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| DNA Ladder 100 Bp (G210 A)     | Fa.Promega, USA |
| 6-faches Loading Dye (G 190 A) | Fa.Promega, USA |
- Ethidiumbromid (0,1 %) Boehringer, Mannheim

#### **2.1.3. Verbrauchsgegenstände und Geräte:**

- Petri-Schalen Corning Glass Works, N.Y. 14831
- Sterile Skalpelle Feather, Japan
- Handschuhe Rehasoft, Hartmann, Deutschland
- Reaktion Röhrchen für 0,2 ml Fa. Thermo Life Sciences, USA
- 1,8 ml sterile Einfrierröhrchen Nunc Cryo Tube Vials, Dänemark
- Eppendorf Gefäße Eppendorf
- Pipetten (0,1-1000 µl) Micro One, STAR LAB, Ahrensburg
- Pipettenspitzen (0,1-1000 µl), RNA-, DNA-, RNase-, DNase, Pyrogen frei STAR LAB, Ahrensburg
- Laminar flow Arbeitsbank Antair BSK
- Gewebe Homogenisator OMNI GLH International
- Vortex-Schüttler Heidolph, Germany
- Zentrifuge Eppendorf 5402, Rotor F-45-18-11 Eppendorf-Netheler-Hinz



- Waage Sartorius
- Thermocycler:
  - UNO Thermoblock Biometra, Göttingen
  - TRIO Thermoblock Biometra, Göttingen
  - Mastercycler gradient Eppendorf
- Gelgießstand Horizon®11.14 (Cat.No.:1068BD) Gibco BRL, USA
- Elektrophoresegerät:
  - Elektrophoresis power supply ST 304 Life Technologies, USA
- UV-Transluminator: Gel Doc 1000 Bio RAD, Hercules, USA
- Videokamera Sony E.A.S.Y. 429 K Sony
- Software:
  - Gel-Erfassungsprogramm:
    - Molekular-Analyst V 1.0/1.1 Bio RAD, Hercules, USA
    - Microsoft Excel 7.0/ Word 7.0 Saturn Hansa, Frankfurt am Main
- Copy Processor Mitsubishi, Japan

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der CXCR-Expression

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Elektronen eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Bei der Rückkehr der Elektronen in den energetischen Grundzustand wird Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren können in einer Immunfärbung verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laser angeregt und das emittierte Licht einer fokalen Ebene gemessen.

Dabei wird jedes Licht, das außerhalb des Fokus liegt, ausgeschlossen. Zur Darstellung der Verteilung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche bzw. der räumlichen Anordnung der Rezeptoren auf der Zellmembran wurden Messungen mit einem Immunfluoreszenzmikroskop bzw. einem Konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt.

### 2.2.1.1. Immunofluoreszenzmikroskopie

LNCaP Prostata-Tumorzellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Vor dem Versuch wurden sie mit warmem FACS-Puffer gewaschen, um abgelöste Zellen abzuspielen. Der FACS-Puffer bestand aus 0,5 % BSA und PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Mit Methanol: Aceton (50/50 v/v,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 ml/Vertiefung) wurden die Zellen für 10 min fixiert. Danach folgten erneut zwei Waschschrte mit PBS. Um die Membranproteine detektieren zu können, wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Phycoerythrin-markierten Antikörpern (**Tab. 4**) pro Vertiefung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte an einem Immunofluoreszenzmikroskop.

### 2.2.1.2. Konfokale Laserscanmikroskopie

#### 2.2.1.2.1. Probenvorbereitung

In eine Petrischale wurden unter sterilen Bedingungen 50 ml Aceton und 1 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan gegeben. Runde Deckgläschen ( $\varnothing$  12 mm) wurden in der Flüssigkeit 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) wurden die Deckgläschen in Vertiefungen einer 24-Loch-Platte (Wuchsfläche: 2  $\text{cm}^2$ ) überführt. Auf die behandelten Deckgläschen wurden LNCaP-Prostata-Tumorzellen in einer Dichte von  $6,25 \times 10^4$  pro ml ausgesät.

#### 2.2.1.2.2. Färbung für Konfokale Laser-Scan Mikroskopie

Um die Zellen von Mediumrückständen zu befreien, wurden sie mit warmem PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Mit einem Fixierungsmittel aus Methanol: Aceton (50/50 v/v,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 500  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung) wurden die Zellen für 10 min. fixiert. Danach folgten erneut zwei Waschschrte mit kaltem PBS. Unmittelbar vor der Antikörperbehandlung wurden die Zellen zusätzlich mit PBS, welches 0,5 % BSA enthielt, gewaschen. Zur Färbung wurden Antikörper (**Tab.4**) in Antikörperpuffer verwendet. Die Zusammensetzung des Antikörperpuffers bestand aus 0,5% BSA und PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Nach einer halbstündigen Inkubation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen dreimal mit Antikörperpuffer gewaschen.

Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, wurden die gefärbten Zellen auf den Deckgläschen mit 5  $\mu$ l Mowiol behandelt und auf einen Objektträger mit der Zellmonolayerseite nach unten eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem computergesteuerten konfokalen Laserscanmikroskop (Leica, Bensheim; x100 Öl-Immersionsobjektiv).

**Tabelle 4:** Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz- und konfokale Laserscanmikroskopie in den entsprechenden Konzentrationen

| Antikörper                         | Konzentration |
|------------------------------------|---------------|
| anti-human-CXCR3-<br>Phycoerythrin | 25 $\mu$ g/ml |
| anti-human-CXCR4-<br>Phycoerythrin | 50 $\mu$ g/ml |
| anti-human-CXCR5-<br>Phycoerythrin | 50 $\mu$ g/ml |

## 2.2.2. Analyse der CXCR und CXCL kodierenden mRNA

### 2.2.2.1. Einführung, Qualität und Quantität der RT-PCR

Die Proteinsynthese ist eine der wesentlichsten Aufgaben der Zelle. Die Information zur Proteinsynthese ist in Form von DNA (*deoxyribonucleic acid*) vorwiegend im Zellkern und dort in Chromosomen lokalisiert. Die Proteinsynthese verläuft in der normalen Zelle von der DNA-Matrize über RNA zum Protein. Die Übertragung der Information von der DNA im Gen auf eine RNA bezeichnet man als Transkription. Die Proteinsynthese von einem RNA-Modell nennt man Translation. Es gibt unterschiedliche RNA-Sorten: messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) und small nuclear RNA (snRNA). Die mRNA spielt bei der Proteinsynthese eine besondere Rolle.

Die RT-PCR-Methode (Polymerase-Ketten-Reaktion) bietet die Möglichkeit, mRNA mittels Amplifikation von cDNA nachzuweisen. Der erste Schritt der RT-PCR ist die RNA-Isolation aus dem Gewebe. Anschließend erfolgt die Herstellung von komplementären c-DNA Ketten mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT-Reaktion) aus den isolierten

mRNA-Strängen. Weiterhin erfolgt bei der PCR-Reaktion eine Vervielfältigung der cDNA mit Hilfe von spezifischen Primern. Die Primer sind Starter-Oligonukleotide. Sie sind an bestimmten Arealen komplementär zu der einzelsträngigen cDNA. Dabei wird eine Doppelstruktur erschaffen. Es gelingt nur mittels PCR eine ausreichende Menge von cDNA herzustellen, um diese mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Eine exakte Qualität und Quantität des Versuches wird durch einen hohen Gewinn der RNA aus den Gewebeproben garantiert. Der minimale Verlust der RNA durch Vermeidung einer Kontamination mit fremder DNA, RNA oder Blockade des Verdau durch biologisch aktive Rnasen steuern auch die positive Bilanz bei den Versuchsergebnissen. Ribonukleasen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die für ihre Aktivität keine Cofaktoren benötigen. Es ist sehr schwierig, diese Enzyme zu deaktivieren. Sie brauchen nur wenige Minuten, um die vorhandene RNA zu zerstören.

Die Ribonukleinsäuren (RNA) sind sehr instabil für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Sie beanspruchen eine besondere Handhabung. Deshalb werden die gewonnenen Proben sofort nach der Gewinnung in flüssigem Stickstoff eingebettet. Die Tätigkeit der Ribonukleasen und die Zersetzung der RNA werden dadurch unterdrückt.

Eine große Behutsamkeit bezüglich der Reinlichkeit ist während und nach der Isolierung der RNA zu leisten, da Hände oder Staubpartikel zur Kontamination führen können. Aus diesem Grund wurden passende aseptische Vorkehrungen bei jedem Experiment vorgenommen. Zum Beispiel wurde auf öfteren Handschuhwechsel, auf sterile Einwegröhrchen und die Benutzung von RNA-, DNA-, RNase-, DNase- und Pyrogen-freien Pipettenspitzen geachtet. Alle Pipettenspitzen waren mit einem Filter ausgestattet und nur einmal zu verwenden. Das Einsetzen von verschmutztem Laborinventar wurde gemieden und jeder Arbeitsschritt unter einer sterilen Laminar-Flow-Arbeitsbank durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in Rnase-freies Aqua dest. eluiert.

Auch bei der Realisierung der RT-PCR mussten die oben erwähnten Maßnahmen strikt eingehalten werden. Es wurde ein Dnase-Verdau vorgenommen, um Bruchstücke an DNA Molekülen zu entfernen. Die einzelnen Arbeitshandlungen wurden zeitlich möglichst nacheinander durchgeführt. Damit konnte die isolierte RNA vor einer Verschmutzung und Zerstörung ihrer Struktur geschützt werden.

Die Präparation der Gewebeproben, RNA-Isolierung, RT-PCR und die Elektrophoresen wurden bei abweichenden Ergebnissen wiederholt. Die Expression von GAPDH in dem Gewebe wurde als Positiv-Kontrolle benutzt, um den ordnungsgemäßen Ablauf des Versuches zu belegen.

### **2.2.2.2. Präparation der Gewebeproben**

Bei jedem experimentellen Ansatz wurden Proben von normalem und Tumorgewebe der Prostata in Zusammenarbeit mit der Pathologie der Uniklinik Frankfurt am Main untersucht. Die Proben wurden freundlicherweise von der Pathologie aus OP-Resektaten der Vorsteherdrüse zur Verfügung gestellt.

Bei der Vorbereitung der Gewebeproben entnahm der Pathologe jeweils zwei Gewebeproben aus einem OP-Präparat, um spätere Versuchsreihen noch einmal wiederholen zu können. Es wurden Versuchsstücke aus sichtbar gesundem Gewebe und Proben aus makroskopisch hochverdächtigen Arealen gewonnen. Dabei war das Stadium des Karzinoms noch nicht aufgeklärt. Bei der Sichtung der Proben konnte der Pathologe die Existenz einer Tumorveränderung bestätigen. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass es bei der Probenentnahme zu keinen Verunreinigungen der Präparate kam. Das Präparationsbesteck und die Arbeitshandschuhe wurden dabei mehrfach gewechselt. Eine maximale Sterilität wurde gewährleistet, in dem man in der Pathologie jeweils eine Probe in ein 1,8 ml steriles Einfrierröhrchen gab. Die frischen Proben wurden direkt nach der Präparation mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Geeignete Behälter mit flüssigem Stickstoff wurden bereitgestellt. Die nativen Probenmaterialien wurden bei -80 °C in einer Kühltruhe für weitere Laboruntersuchungen gelagert.

### **2.2.2.3. Aufarbeiten der Prostata-Proben**

Die nativen Proben wurden bei -80 °C in der Kühltruhe aufbewahrt. Als nächster Schritt folgte die RNA-Isolierung. Zum Anfang sollten sterile Petri-Schalen, sterile Skalpelle und Handschuhe bereitgestellt werden. Auf eine geeignete Beschriftung der Behälter war zu achten. Die Proben wurden unter reinen Bedingungen in einer in Betrieb gesetzten Arbeitsbank von der Kühltruhe auf Eis transportiert und erst dann für weitere Vorhaben benutzt. Eine angemessene Zahl von Proben sollte die Arbeit erleichtern und einer Veränderung der zu gewinnenden RNA vorbeugen.

### **2.2.2.4. RNA-Isolierung**

Die Gewinnung von RNA aus normalem und Tumorgewebe der Prostata wurde mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits durchgeführt. Zur besseren Beschreibung wird die RNA Isolierung unten in Schritten dargestellt:

#### 2.2.2.4.1. Zerkleinerung und Lyse der Proben

Als erste Handlung bei der RNA-Isolierung wurden 0,2 g - 0,3 g Gewebestückchen aufgetaut und eingewogen. Man stellte das normale und Tumorgewebe in kleine Petrischalen. Die Proben wurden sofort mit einem Mix aus RLT-Puffer und Mercaptoethanol benetzt. Die Verdünnung des RLT-Puffers mit Mercaptoethanol in der Lösung ist 1:100 (z.B. 10 ml RLT-Puffer + 100 µl Mercaptoethanol). RLT-Puffer ist eine Substanz, die die Zellen auflöst. Das Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken, die die Formation der Nukleinsäuren stabilisieren.

Nun wurden mit einem sterilen Skalpell die Proben zerkleinert. Die zerstückelten Proben wurden in 1,8 ml sterile Einfrierröhrchen überführt. Es folgte die Homogenisierung mit OMNI GLH Homogenisator auf Stufe 4 ca. 20 sec. lang.

#### 2.2.2.4.2. Zentrifugation durch QIAshredder

Das Lysat wurde in QIAshredder überführt. Die Probe wurde 2 min. bei höchster Umdrehung 14000 U/min. zentrifugiert. Der Filter des QIAshredders wurde verworfen. Bei dieser Prozedur wurde das Lysat von groben Gewebeformen befreit. Durch Zentrifugation erreichte man zusätzlich eine Viskositätsreduktion des Lysats.

#### 2.2.2.4.3. Zugabe von Ethanol

Dem homogenisierten Lysat fügte man 1 Volumenteil 70 % Ethanol (auf das doppelte Volumen) hinzu. Es folgte kurzes Schwenken und Vortexen (ca. 15 sec.). Die Ethanolzugabe führte zur Präzipitation (Fällung) der RNA.

#### 2.2.2.4.4. Bindung der totalen RNA

Das Lysat wurde in Rneasy mini spin Röhrchen überführt. Es war darauf zu achten, dass das Rneasy mini spin ein Fassungsvermögen von maximal 700 µl besitzt. Die Menge wurde bei 10000 U/min. 15 sec. lang zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das ganze Lysat in das Rneasy mini spin aufgetragen war. Das Zentrifugat wurde verworfen, aber das „Collection tube“ weiter verwendet. Die RNA bindet sich an die Membran des RNAeasy mini spins. Diese Art von Adsorption gewährleistet die Gewinnung der totalen RNA.

#### 2.2.2.4.5. Waschen

Es folgte der Waschvorgang mit in das Rneasy mini spin Röhrchen einpipetierten 700 µl RW 1 Puffer. Die Lösung wurde 15 Sekunden lang bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, aber die „Collection tube“ nicht. Durch diese Handlung wurden zusätzliche Kontaminationstoffe in dem RNA Lysat entfernt.

#### 2.2.2.4.6. DNase-Verdau

Es folgte der Dnase-Verdau auf der Membran des Rneasy mini spin mittels RNase-free DNase-Set. Dieser Verdau wurde durchgeführt, um noch eventuell vorhandene DNA zu entfernen.

Die Herstellung von DNase-Verdau Stock-Lösung erfolgte, in dem man 1500 Kunitz Einheiten Dnase I Lyophylisat in 550 µl Rnase-freiem Wasser löste und aliquotierte. Es entstand eine Konzentration von 2,72 Einheiten pro µl. Als Kunitz Einheit bezeichnet man die Menge von Dnase I, die eine Erhöhung in  $A_{260}$  von 0,001 mm pro Minute bei 25 °C, pH 5 erzwingt. Die Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

Zum Einsatz kamen 10 µl DNase I Stock Solution und 70 µl RDD Puffer, die kurz zuvor aufgetaut und zusammengefügt wurden. So gelangten in jedes Röhrchen 27,27 Kunits Einheiten DNase I. Es schloss sich die Gabe dieser 80 µl direkt auf die Membranmitte der Rneasy silica gel-Röhrchens an. Das Gemisch wurde bei 20 -30 °C für 15 min. inkubiert. Die noch anwesende DNA wurde dabei zerstört.

Um die DNase zu entfernen, wurden 350 µl RW 1 Puffer auf die Membran gegeben und bei 10000 U/min. 15 Sekunden zentrifugiert. Man stellte das Rneasy Mini spin in ein neues „Collection tube“. Nun fügte man 500 µl RPE Puffer hinzu. Der RPE Puffer wurde vor Gebrauch mit Ethanol abs. zur Analyse versetzt. Die Proben wurden 15 sec. bei 10000 U/min. zentrifugiert. Das Zentrifugat und das „Collection tube“ wurden verworfen. Das Rneasy Mini spin hob man auf und brachte es in ein neues „Collection tube“ an.

Erneut wurden 500 µl RPE Puffer auf die Membran des Rneasy Mini spins gegeben und die Proben 2 min. bei 10000 U/min. zentrifugiert.

#### 2.2.2.4.7. Eluation der totalen RNA

Das Rneasy mini spin stellte man in ein steriles Eppendorf-Röhrchen (mit Verschluss). Es wurden 30 bis 50 µl Rnase-freies Aqua dest. direkt auf die Membranmitte pipettiert. Nach einem Zeitraum von 2 Minuten Einwirkzeit zentrifugierte man dann den Inhalt 1 Minute lang bei 10000 U/min. Dadurch wurde die mRNA aus der Membran eluiert.

#### 2.2.2.4.8. Lagerung der RNA-Eluate

Die wässrige RNA-Lösung sollte möglichst schnell für den RT-Ansatz verwendet oder bei -80 °C eingefroren werden.

## 2.2.2.5. Die cDNA-Synthese (Reverse Transkriptase-Reaktion)

### 2.2.2.5.1. Einführung, Qualität und Quantität der Reverse Transkriptase-Reaktion

Bei diesem Schritt der Reaktion wurden von der isolierten mRNA mittels des Enzyms Reverse Transcriptase (RT aus Retroviren isoliert) komplementäre cDNA Kopien (*complementary DNA*) hergestellt. Die Reverse Transcriptase ist eine RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Die RT kann RNA und DNA Einzelstränge als Matrize verwenden. Damit die Reverse Transcriptase-Reaktion erfolgen kann, braucht die RT einen Startpunkt. Das erreichte man durch die Zugabe eines 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primers, der am 3'-Ende der mRNA bindet (*Gangolf et al., 1999*). Die Synthese verläuft von 5' zum 3'.

Bei der RT-Reaktion hybridisieren die langen Poly-AAA Sequenzen der mRNA mit einem Thymin-Oligonukleotid. Es wird ein DNA-RNA-Hybrid hergestellt. Als Teilaktivität weist die Reverse Transkriptase eine Ribonuklease (Rnase H) auf. Dieses Enzym hydrolisiert den RNA Teil des entstehenden Hybridstranges. Nachkommend wird der cDNA-Doppelstrang synthetisiert. Das Enzym für diese Reaktion ist die Reverse Transkriptase (*Löffler et al., 1998*).

Die Auswahl von spezifischen Primern gewährleistet, dass nur gewünschte Matrizen in cDNA umgeschrieben werden. Die meisten Moleküle der eukaryotischen mRNA sind an den 3'-Enden polyadenyliert. Aus diesem Grunde lässt sich mit dem Einsatz von komplementären Oligonukleotiden möglichst die gesamte mRNA Sequenz in cDNA umschreiben. Die mRNA hat einen Anteil von 2 - 4 % der gesamten RNA in der Zelle (*Gangolf et al., 1999*).

Im Prinzip reicht eine Genbank von  $10^5$  Rekombinanten, um die Anwesenheit der mRNA in der Zelle aufzuzeigen. Das RNA- Isolat ist von dem Zelltyp und Gewebe abhängig. Es lässt sich jedoch postulieren, dass aus 1 g Gewebe ( $5 \times 10^8$  Zellen) 0,5 - 30 mg RNA zu isolieren sind. Wenn man annimmt, dass die mRNA 2 - 4 % der RNA darstellt, muss man mindestens 0,01 mg RNA absondern, um die Präsenz von mRNA nachzuweisen.

In dem vorliegenden Versuch wurde das Enzym Superscript II RT verwendet. Dies ist eine M-MLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) - Reverse Transkriptase, die keine DNA-Endonuklease Aktivität besitzt. Sie weist aber eine Punktmutation in der Rnase-H-kodierenden Sequenz auf. Demzufolge fällt der Abbau der RNA während der Synthese des



ersten Stranges aus. Die Folge dieser Gegebenheit ist, dass mehr Mengen cDNA produziert werden (*Newton et al., 1994*).

#### 2.2.2.5.2. Ausführung der cDNA-Synthese

Für jede Gewebeprobe (normales versus Tumorgewebe) wurden jeweils 2 kleine sterile Eppendorf Gefäße mit Verschluss in der Reihenfolge - N für Normal und T für Tumor - beschriftet und bereitgestellt. Alle Proben vom RT-Ansatz kühlte man bei -4 °C ständig auf dem Thermocycler (UNO-Thermoblock). Die RT-Reaktion begann mit Pipettieren von je 11 µl isolierter RNA in die sterilen Eppendorf Gefäße. Bei jedem Pipettieren sollte man auf eine neue Pipettenspitze achten. Es folgte die Zugabe von 8 µl Mix in jedes Eppendorf-Gefäß. Der Mix setzte sich zusammen aus:

4 µl First strand buffer (Fa. Invitrogen)

+

2 µl DTT

+

1 µl Oligo dT<sub>15</sub> (Primer p (DT)<sub>15</sub> für cDNA synthesis Kat.No.814270, Fa. Roche)

+

1 µl dNTP's. (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 1 mM Tris HCl [pH 7,5] gelöst)

Es folgte die Gabe von 1 µl Superscript II RT 200 U (*Reverse Transkriptase; Fa. Invitrogen*) in jedes Röhrchen. Das ergab eine Menge von 20 µl pro Ansatz.

Das Gemisch wurde dann in dem Thermocycler (TRIO Thermoblock) inkubiert. Der Prozess durchlief 35 Zyklen bei Programm -5 in drei Stufen:

| RT Programm     |            |        |
|-----------------|------------|--------|
| Programmstufe   | Temperatur | Dauer  |
| Stufe 1         | 70 °C      | 10 min |
| Stufe 2         | 42 °C      | 60 min |
| Stufe 3         | 70 °C      | 10 min |
| Stufe 4 (Pause) | 4 °C       | -      |

In Stufe 1 wurde der mRNA Primer Mix denaturiert. In Stufe 2 erfolgte die eigentliche cDNA-Synthese nach Zugabe von Superscript II RT. In Stufe 3 wurde das Enzym inaktiviert. In Stufe 4 wurden die Proben gelagert. Danach fror man die Ansätze entweder bei -80 °C ein oder sie wurden weiter für die PCR verwendet.

### 2.2.2.6. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 2.2.2.6.1. Einführung, Qualität und Quantität der PCR

Die PCR ist eine hoch sensitive und spezifische Methode. Bei diesem Vorgang wird die in cDNA umschriebenen mRNA vervielfältigt. Die Methode der PCR wurde zum ersten Mal 1984 von Kary Mullis beschrieben. Die PCR ist heute eine der am meisten benutzten Verfahren in der Molekularbiologie. In Wirklichkeit besteht die PCR aus einer Wiederholung der Denaturierung der cDNA, Anheftung der spezifischen Oligonukleotide an ihren komplementären Strang und Gegenstrang sowie die Zusammenfügung von weiteren DNA-Strängen mit Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen. Die Wiederholungszyklen mit den verschiedenen Temperatureinstellungen werden von einem automatisierten Thermostaten (Thermocycler) durchgeführt. Bei einer mehrfachen Wiederholung der Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Die Kopienzahl der Reaktion stellt sich durch die Gleichung dar:

$$Z = (2^n - 2n) \cdot x$$

Z - Kopienzahlen

n - Anzahl der Vermehrungszyklen

2n - Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist

x - Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize

Theoretisch besteht eine Verdoppelung der DNA Menge bei diesem Prozeß. Nach 20 Zyklen sollte eine  $2^{20}$  (=  $10^6$ )-fache DNA Amplifizierung erreicht werden. In der Realität ist aber von einer  $10^5$ -fache Vervielfachung auszugehen. Dazu tragen eine Abnahme der Aktivität der DNA Polymerase und der Hybridisierungsmöglichkeiten der Primer, nach 25 bis 30 Zyklen, bei (*Newton et al., 1994*).

Die Quantität der PCR hängt von der Wahl der Annealing-Temperatur und von den Primern ab, die zur Anheftung benutzt werden. Bei den Primern sollten Länge und

Zusammensetzung bedacht werden. Die Annealing-Temperatur wird 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur des DNA Doppelstranges angesetzt. Dabei bindet der Primer nur an seinen komplementären Strang. Bei höheren Temperaturen kommt es zur Bildung von Basenfehlpaarungen. Dadurch tauchen Fehler in der Doppelstrangbildung auf und die Ausbeute der DNA ist nicht vollkommen (*Gangolf et al., 1999*).

Eine gute Qualität wird auch durch Vermeidung von Kontaminationen erreicht. Es können Fremd-DNA multipliziert werden, die nicht der Ausgangsmatrize entsprechen. Es empfiehlt sich das Mitführen von Negativkontrollen und sauberes Arbeiten. Bei abweichendem Produkt ist der Einsatz der so genannten „Hot Start“ PCR am besten. Dabei werden die Primer von den anderen Reaktionskomponenten mittels Wachs getrennt. Das Zusammenkommen der Reagenzien findet bei der Denaturierung (höhere Temperaturen) statt. Die unspezifische Hybridisierung der Primer wird somit abgewehrt.

Bei der Durchführung der PCR wurde eine DNA-Polymerase verwendet, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und thermostabil ist. Diese *Taq*-Polymerase hat eine 5'-3' - Exonuklease-Aktivität. Über eine 3'-5' - Exonuklease-Aktivität verfügt sie nicht. Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 75 °C. Eine Halbwertszeit von 5 min. wird bei 100 °C erreicht (*Gangolf et al., 1999*).

#### 2.2.2.6.2. Ausführung der PCR Reaktion

Es wurden kleine Mikroröhrchen (0,2 ml) mit CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, GAPDH beschriftet. Dies entspricht dem Chemokin-Profil, das in den Proben nachgewiesen werden soll. Aus dem RT-Ansatz wurden in jedes Gefäß 2 µl cDNA einpipettiert. Es folgte die Zugabe von je 7,5µl PCR-Mix. Der Mix wurde durch Beifügung der folgenden Komponenten bereitgestellt:

5 µl 10x PCR Rxn-Puffer (-Mg Cl<sub>2</sub>)

+

1,5 µl 50 mM Mg Cl<sub>2</sub>

+

1 µl dNTP Mix 10mM Gibco (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 1 mM Tris HCl [pH 7,5] gelöst)

Es folgte das Zusammenpipettieren von 500 µl 10-facher PCR Rxn-Puffer (-Mg Cl<sub>2</sub>), 150 µl Mg Cl<sub>2</sub> und 100 µl dNTP`s. Dies entspricht einer Vorratslösung für 100 Proben. Den Mix bewahrte man im Kühlschrank bei -4 °C auf.

In jedes Gefäß wurde 0,5 µl Primer forward (100 pmol) und 0,5 µl Primer reverse (100 pmol) gegeben. Danach wurde je 39 µl Aqua dest. einpipettiert.

Eine Menge von 0,5 µl Platinum *Taq*-Polymerase fügte man jedem Gefäß zu. Dieses Enzym stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Die Platinum *Taq*-Polymerase ist bei Temperaturen von 90-95 °C stabil.

Alle Gefäße wurden zentrifugiert. So sollten sich Partien der Lösung, die noch an der Wand des Röhrchens haften, zu einer gemeinsamen Reaktionsflüssigkeit zusammenfügen.

Danach wurden alle Proben bei Programm Chemok 60 °C, in dem Thermocycler (Mastercycler gradient) für die Dauer von 35 Zyklen inkubiert.

| PCR Programm:                   |                |            |           |
|---------------------------------|----------------|------------|-----------|
| Prozess                         | Programmzyklus | Temperatur | Zeitdauer |
| Denaturierung                   | Stufe 1        | 95 °C      | 2 min     |
| Denaturierung                   | Stufe 2        | 95 °C      | 30 sec    |
| Annealing (Anheften der Primer) | Stufe 3        | 60 °C      | 30 sec    |
| Synthese                        | Stufe 4        | 72 °C      | 30 sec    |
| Abschlußsynthese                | Stufe 5        | 72 °C      | 10 min    |
| Pause                           | Stufe 6        | 4 °C       | -         |

Der Prozess begann mit einer Denaturierung in Stufe 1. Die Amplifikation umfasste Stufe 2, 3 und 4 des Programms. Der Zyklus von Denaturierung, Anheften der Oligonukleotide und Bildung von neuen Doppelsträngen wiederholte sich 35-mal. Die optimale Zahl der Zyklen wurde durch Betrachtungen der PCR Ergebnisse standardisiert und in jedem nachfolgenden Versuch übernommen. Bei 72 °C erfolgte die Prolongation mit Hilfe der *Taq* Polymerase. Die Stufe 5 wurde angeschlossen, um die Synthese zu vollenden.

Bei der PCR galt die GAPDH als Negativkontrolle.

Die vervielfachte cDNA wurde dann mittels Gelelektrophorese weiter analysiert.

## 2.2.2.7. Gelelektrophorese und Dokumentation des Versuches

### 2.2.2.7.1. Auftrennung der cDNA-Synthese Erzeugnisse mittels Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wurden die cDNA-Syntheseprodukte unter Stromspannung versetzt und getrennt. Die DNA ist negativ geladen und läuft in dem Gel zum positiven Pol (Anode) des Elektrophoresegerätes. Die DNA-Fragmente wandern mit verschiedener Geschwindigkeit, die von der elektrischen Feldstärke, der Konzentration des Laufpuffers und der Konsistenz des Gels abhängig sind. Die DNA mit großem Molekulargewicht läuft langsamer und legt eine kürzere Strecke in der Laufbahn des Gels zurück, als solche mit kleinerem Molekulargewicht. Die Menge der DNA wird von der Wanderstrecke unter Spannung im Gel bestimmt. Ein mitlaufender Basenpaarleiter soll das Ablesen der Fragmentengröße ermöglichen und als Standardkontrolle dienen.

### 2.2.2.7.2. Ausführung der Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese begann mit der Vorbereitung von 1-fachem TBE-Puffer. Die einfache Konzentration wurde erreicht, indem 200 ml eines 5-fachen TBE-Puffers auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt wurde.

Zur Herstellung des 1,4%igem Agarosegels wog man zuerst in ein 500 ml Becherglas 1,4 g Agarose mittels Laborwaage. In einem Becherglas wurden ca. 110 ml einfacher TBE Puffer zugefügt. Die Differenz von 10 ml berücksichtigt die Verdunstung während des Erhitzens in der Mikrowelle. Die Agarose löste man 3 Minuten bei 700 Watt in der Mikrowelle (*Miele*). Danach wurden 2 µl Ethidiumbromid in das noch flüssige Gel pipettiert und durch leichtes Schwenken verteilt. Es ist darauf hinzuweisen, dass das Ethidiumbromid eine giftige Substanz ist, die vorsichtige und geschützte Anwendung voraussetzt. Starkes Schwenken sollte das Entstehen von Luftblasen- und evtl. Flockenbildung verhindern. Durch die nachfolgende Zugabe von Ethidiumbromid bewirkte man eine homogene Verteilung des Stoffes im Agarosegel. Für die Darstellung von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 200 und 6000 Basenpaare war das Gießen von 1,2-1,5%igem Gel notwendig (*nach Sambrook et al., 1989*).

Der Gelgießstand bestand aus:

- 1 horizontale (Flachbett) Gelkammer
- 1 Gelträger

- 2 Keile, um den Gelträger zu fixieren, um das Auslaufen des flüssigen Gels zu verhindern.
- 2 Käbme für 20 Gel-Taschen

Das flüssige Gel wurde vorsichtig in den Gelträger eingefüllt. Mit einer Pipettenspitze entfernte man vorhandene Luftblasen. Es dauerte ungefähr 40 min., bis das Gel erstarrte. Als das Gel fest war, wurde der Gelträger in die Pufferwanne überführt, in der bereits einfacher TBE-Puffer als Laufpuffer eingefüllt war. Die Käbme sollten vorsichtig, nicht verkantet herausgezogen werden. Die Taschen sollten dabei intakt bleiben.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit 0,5 µl „Blue Run“ (10x blue juice gel loading buffer) mit der Multipipette versetzt.

Es wurden 10 µl von jeder mit „Blue Run“ versetzten Probe in eine Gel-Tasche pipettiert. Zum Ablesen der Basenpaargröße der untersuchten Proben pipettierte man 7,5 µl Basenpaarleiter in eine Geltasche am Gelrand. Um den Basenpaarleiter als gebrauchsfertige Lösung einzusetzen, wurden 250 µl DNA ladder und 50 µl 6 x Loading Dye (G190A) zusammengefügt.

Nachdem alle Proben in die Geltaschen einpipettiert worden waren, versetzte man die Gelkammer unter Stromspannung. Dies geschah mit Hilfe von einem Elektrophoresegerät bei 120 - 160 Volt für ca. 30 - 40 Minuten. Die Banden sollten bis Mitte der Laufbahn unter der Stromspannung wandern. Danach konnte das Ergebnis abgelesen werden.

### **2.2.2.7.3. Darstellung der DNA-Fragmente mittels UV-Gerät**

Bei der Darbietung der DNA-Fragmente wurden die Fluoreszenzeigenschaften von Ethidiumbromid zunutze gemacht. Bei der Zugabe lagert sich diese Substanz an die große Furche der DNA. Diese Reaktion bezeichnet man als Interkalation. Die Interkalation des Stoffes erfolgte bei der Wanderung der Nukleinsäuren-Fragmente durch das Gel unter Stromspannung. Durch Interaktion mit den Basen der Nukleinsäuren kommt es zu einer Verstärkung der Eigenfluoreszenz des Stoffes, verglichen mit dem nicht gebundenen Zustand. Die DNA wurde unter UV Anregung (254, 302 oder 366 nm) mittels UV-Transluminator (Gel Doc 1000; Bio RAD) visualisiert. Die Ethidiumbromid-DNA-Komplexe erschienen als rot-orange leuchtende Banden.

#### 2.2.2.7.4. Erfassung der Gele

Die fluoreszierenden DNA-Fragmente wurden mit der Videokamera und dem Gel-Erfassungsprogramm (*Molekular Analyst 1.0; Biorad*) digital dokumentiert. Die Belichtungszeit, die Vergrößerung und das Fokussieren des gefärbten Gels wurden passend ausgewählt, damit auch schwache Banden dargestellt werden konnten. Natürlich wurde auf die Schärfe des Bildes geachtet. Ein Fotoausdruck wurde für die persönlichen Unterlagen aufbewahrt.

#### 2.2.2.7.5. Auswertung des Versuches

DNA-Fragmente wurden mit dem Programm *Molekular Analyst 1.0; (Biorad)* ausgewertet. Um die Ergebnisse quantifizieren zu können, wurde die Helligkeit der Banden mittels einer Pixel-Intensitäts-Analyse untersucht. Die Pixelzahlen und der „Volume Count“ pro mm<sup>2</sup> Ausschnittsfläche wurden als maßgebende Parameter der Auswertung herangezogen.

Zur Bestimmung der Hintergrundintensität wurde die Pixel-Intensität von dem Teil des Gels ermittelt, dessen Leuchtsignale verrechnet werden sollten. Dieser Teil war auf der Höhe der Banden und wies keine Gel-Verfärbungen auf. So konnte theoretisch ein Standard-Hintergrund definiert werden. Da diese Hintergrundintensität von der Belichtung und der Zusammensetzung des Gels abhängig ist, ist diese Messung nicht sehr aussagekräftig. Die Standard-Hintergrundintensität wurde somit nicht berücksichtigt. Die spezifische Bandenintensität der Chemokine wurde vielmehr mit derjenigen der GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verglichen.

Die Helligkeit der jeweils zu analysierenden Banden diente als ein Aussagekriterium für die Menge der DNA. Das RT-PCR Produkt sollte der vom Gewebe isolierten RNA proportional sein. Deshalb war es möglich, anhand der Leuchtstärke der Banden auch die Menge der isolierten RNA zu quantifizieren. Um den Vergleich zwischen den einzelnen Banden durchzuführen, musste bekannt sein, welche RNA-Mengen eingesetzt wurden. Diese quantitative RNA Messung wurde durch Bestimmung von internen Synthesestandards, die mit denselben Primersequenzen wie die Ziel-mRNA vervielfältigt werden, erreicht. Dies war durch die parallele Kontrollreaktion mit sogenannten Haushaltsgenen möglich. Die Regulation ihrer Expression in den jeweiligen Zellen erfolgt unabhängig von einem Stimulus. Sie werden konstitutiv exprimiert und sind für das Überleben der Zelle essentiell. Die Bandenintensität der Haushaltsgene ist also genau dann gleich stark, wenn exakt die gleichen

RNA-Mengen eingesetzt werden. Ein Vertreter dieser Haushaltsgene ist die GAPDH. Alle Banden wurden über die GAPDH-Bande gemittelt und mengenmäßig verrechnet. Durch die Beurteilung der Bandenintensität konnte man die Mengenverhältnisse der RNA und daher die Veränderungen der Genaktivität der Zelle feststellen.

### **2. 3. Statistik**

Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte durch den "Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test". Dieser Test erlaubt den Vergleich zweier unabhängigen Datengruppen bei einer nicht normal verteilten Grundgesamtheit. Da biologische Phänomene selten der Gauß'schen Normalverteilung folgen, empfiehlt sich dieser nicht parametrische Test um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. Dabei wurden Differenzen als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$  war.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einblick

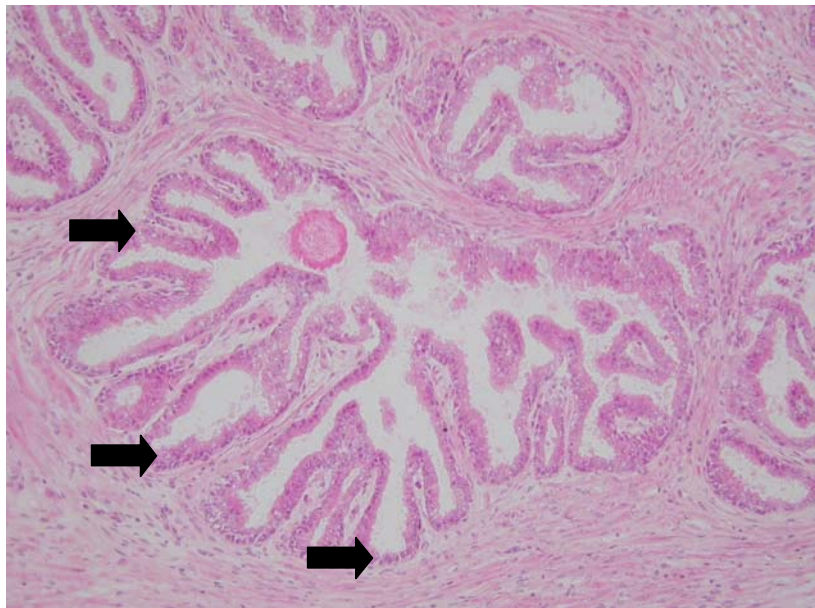
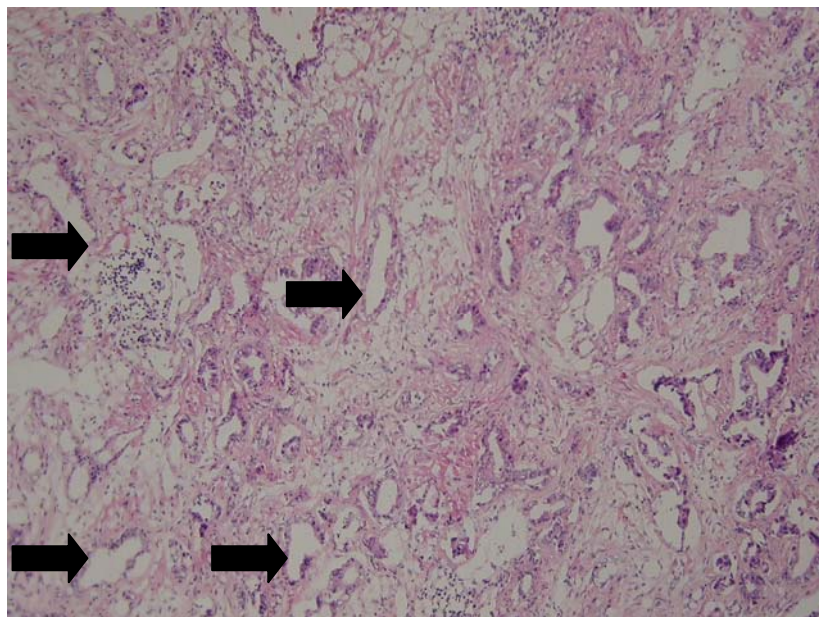
Die methodische Grundlage dieses Experiments beinhaltete die Untersuchung der löslichen CXCL Chemokine sowie membranständiger Rezeptoren, CXCR, in normalen und bösartigen Gewebeproben der Prostata mittels *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Weiterhin wurden die Chemokin-Rezeptoren mittels Immunofluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Laserscanmikroskopie erfasst.

Die Isolierung intrazellulärer RNA, die Umschreibung in cDNA und die Vervielfältigung derselben stellten ein sensitives Vorgehen zum Nachweis der Genexpression der Chemokine und Chemokin-Rezeptoren dar. Die Immunofluoreszenzmikroskopie bzw. konfokale Laserscanmikroskopie diente der Aufklärung des Oberflächenverteilungsmusters der CXCR Chemokin-Rezeptoren.

Es wurden insgesamt 50 Patienten mit jeweils zwei Gewebeproben untersucht. Die erste Probe stammte aus einem gesunden Areal der Prostata. Als Gegenüberstellung wurden Gewebestücke aus makroskopisch hochverdächtigen bösartigen Zonen der Prostata gewonnen. Beide Proben wurden von der pathologisch auffälligen Prostata eines Patienten präpariert. Durch die insgesamt 100 untersuchten Gewebeproben wurden Veränderung des Chemokin-Profilmuster und die Aktivität der Chemokin-Rezeptoren festgestellt und evaluiert.

#### 3.2. Darstellung von Prostatatumorgewebe im pathologischen Schnellschnitt

Nach der radikalen Prostataentfernung aller untersuchten Patienten wurden Schnellschnitte im Zentrum der Pathologie zur Absicherung und Klarstellung der Befunde angefertigt. Strukturelle Veränderungen zwischen normalem und Karzinomgewebe konnten anschließend mikroskopisch dargestellt werden. **Abbildung 1** demonstriert repräsentativ morphologisch auffällige Differenzen zwischen beiden Proben.

**A:****B:**

**Abbildung 1:** Mikroskopische Schnellschnittbilder in 100-facher Vergrößerung von Prostatagewebe; **1A:** normales Prostatagewebe; **1B:** Prostatagewebe mit Karzinomveränderungen

In **Abbildung 1** sind Schnellschnittbilder von normalem und Prostatatumorgewebe abgebildet. In dem normalen Gewebe (**Abb. 1A**) sieht man eine regelrecht angeordnete

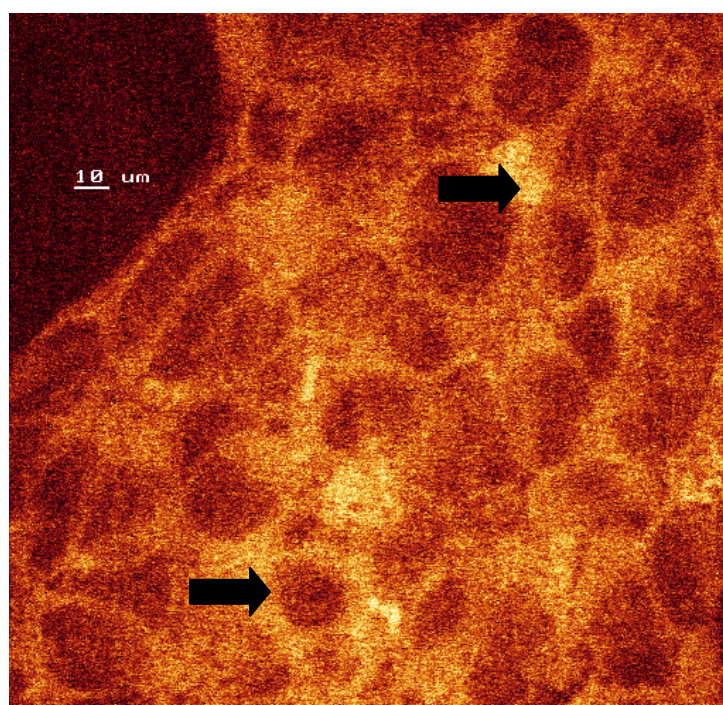
Struktur der Prostata Drüsen (siehe Pfeile). Das Drüsenepithel ist zweireihig auf der Basalmembran angeordnet. Das Tumorgewebe (**Abb. 1B**) zeichnet sich durch eine inhomogene, unruhige, destruierte Struktur aus. Die Drüsen sind zerstreut und das Drüsenepithel ist einreihig auf der Basalmembran angeordnet (siehe Pfeile). Es liegen Zellatypien vor. Es sind gravierende Unterschiede in der Gewebestruktur der beiden Präparate festzustellen.

### 3.3. Analyse der Chemokin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Prostata tumorzelllinie LNCaP

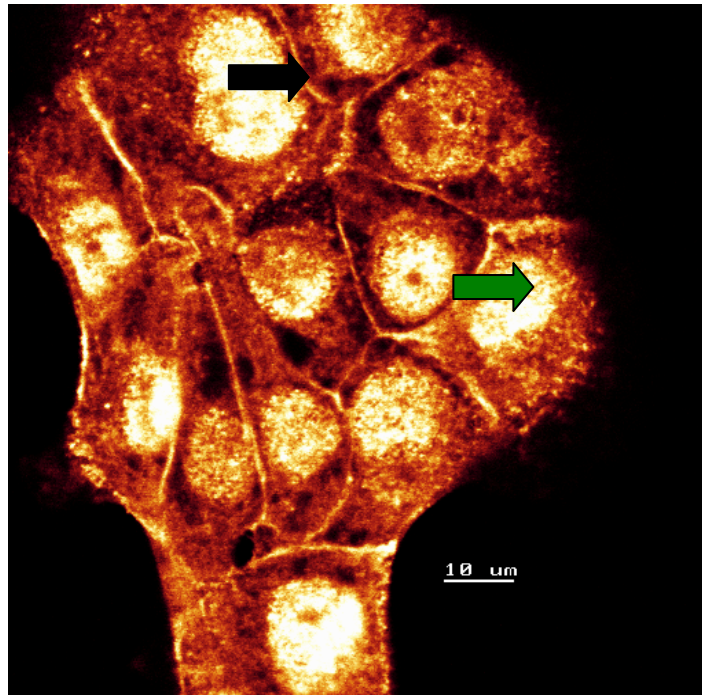
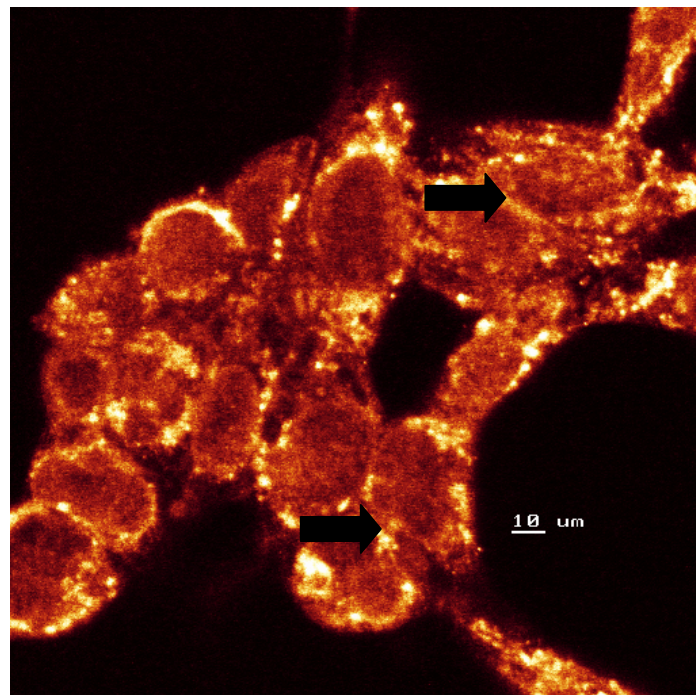
#### 3.3.1. Konfokale Laserscanmikroskopie

Da sich die Raumverteilung bzw. die lokale Anordnung der Rezeptoren in dem untersuchten Tumorgewebe nicht exakt darstellen ließ, wurde die räumliche Rezeptorverteilung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie an einem *in vitro* Zellkulturmodell dargestellt. Die Experimente konzentrierten sich dabei auf das Verteilungsmuster der CXCR3-, CXCR4- und CXCR5-Chemokin-Rezeptoren auf LNCaP-Tumorzelllinien. Das unten präsentierte Ergebnis (**Abbildung 2**) stellt die Oberflächenverteilung der oben genannten Rezeptoren dar. Die unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren wurde miteinander verglichen.

A:





**B:****C:**

**Abbildung 2 A - C:** Repräsentative Darstellung des Oberflächenverteilungsmusters der Chemokin-Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR5 bei der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels Konfokaler Laserscanmikroskopie **A:** CXCR3-Rezeptor-Darstellung; **B:** CXCR4-Rezeptor-Darstellung; **C:** CXCR5-Rezeptor-Darstellung

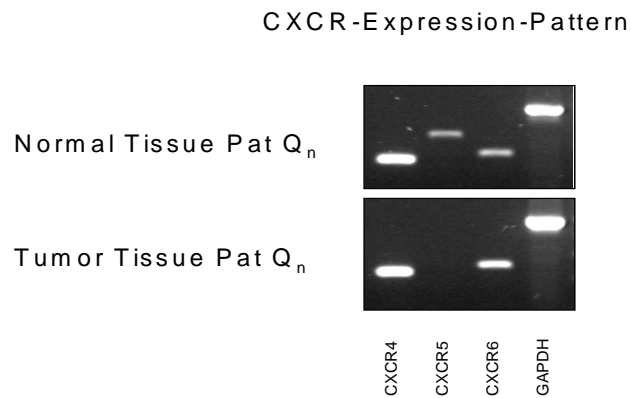
Wie Abbildung 2A erkennen lässt, zeigt sich ein homogenes Bild in der Verteilung von CXCR3. Offensichtlich sind CXCR3 zytoplasmatisch angereichert, wobei Rezeptoren

vereinzelt auch an den Zell-Zell-Grenzen nachzuweisen sind. Pfeile verdeutlichen diesbezüglich hell gefärbte Areale zwischen den Zellen. Ein interessantes, von CXCR3 abweichendes Verteilungsmuster zeigt CXCR4. Der Chemokin-Rezeptor 4 ist eindeutig an den interzellulären Grenzen lokalisiert, erkennbar an den hell gefärbten Linien (siehe schwarzer Pfeil) zwischen den einzelnen Zellen in Darstellung **2B**. Darüber hinaus sind CXCR4-Rezeptoren auch intrazellulär um die Zellkerne herum akkumuliert. Offensichtlich wird dies durch eine Erhöhung des Farbsignals in diesen Regionen (siehe grüner Pfeil). Darbietung **2C** bildet die Oberflächenverteilung der CXCR5 an den Zell-Zell-Grenzen ab. Die Verstärkungen des Farbsignals sind in diesen Arealen nicht sehr deutlich wie in der Verteilung des CXCR4 und vornehmlich punktuell angeordnet. Es sind nur vereinzelte, lokal begrenzte Anfärbungen im Bild zu beobachten (siehe Pfeile).

### **3.4. Quantitative Darstellung der CXCR-kodierenden mRNA in normalen und bösartigen Gewebeproben der Prostata**

In dem Versuch wurde die CXCR1-, CXCR2-, CXCR3-, CXCR4-, CXCR5- und CXCR6-Expression in gesunden und bösartigen Anteilen der entfernten Prostata untersucht und in Relation zueinander gestellt.

Zur Untersuchung der CXCR-kodierenden mRNA wurde die RNA aus normalen und bösartigen Gewebeproben der Prostata isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR amplifiziert. Durch Gelelektrophorese wurde die amplifizierte cDNA getrennt und quantitativ dargestellt. Die Position der äquivalenten mRNA ist anhand des eingesetzten Basenpaarleiters zu ermitteln.



**Abbildung 3:** Semiquantitative Darstellung der CXCR4-, CXCR5- und CXCR6-kodierenden mRNA mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wird das house-keeping gene GAPDH verwendet.

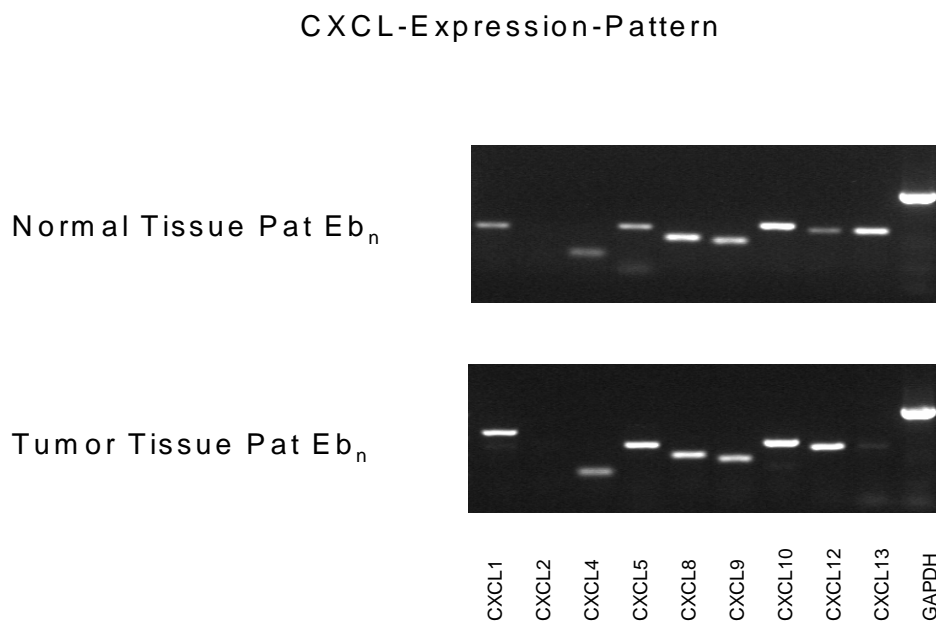
**Abbildung 3** demonstriert an einer repräsentativen Gewebeprobe, dass die mRNA der CXCR4, CXCR5 und CXCR6 in normalem und Tumorgewebe der Prostata unterschiedlich exprimiert werden. Auffällig ist insbesondere der Verlust an CXCR5 im Tumorgewebe. Bezüglich der CXCR1-CXCR3 Expression konnten keine Differenzen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die experimentell ermittelten Fragmentenlängen entsprachen den theoretisch zu erwartenden Größen und sind in **Tabelle 5** unten aufgezeigt:

**Tabelle 5:** Fragmentlänge der CXCR4 - 6

| CXCR-Bande | Erwartete Fragmentenlänge |
|------------|---------------------------|
| CXCR4      | 227 bp                    |
| CXCR5      | 340 bp                    |
| CXCR6      | 250 bp                    |
| GAPDH      | 503 bp                    |

Neben dem Verlust an CXCR5 ist, unter Berücksichtigung der GAPDH-Kontrolle, eine Reduktion der CXCR4- und CXCR5-Expression und gleichzeitige Erhöhung der CXCR6-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zur „normalen“ Probe auffällig.

### 3.5. Quantitative Darstellung der CXCL-kodierenden mRNA in normalen und bösartigen Gewebeprobe der Prostata



**Abbildung 4:** Semiquantitative Darstellung der CXCL1-, CXCL2-, CXCL4-, CXCL5-, CXCL8-, CXCL9-, CXCL10-, CXCL12-, CXCL13-kodierenden mRNA mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wird das house-keeping gene GAPDH benutzt.

Nach gleichartigem Muster wie bei der Darstellung der Chemokin-Rezeptoren wurde das Expressionsmuster der Chemokin-Liganden CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 untersucht. **Abbildung 4** demonstriert repräsentativ eine Messserie und verdeutlicht die Expressionsverhältnisse zueinander. Als Positivkontrolle diente erneut das *house-keeping gene* GAPDH. Die Fragmentenlänge der einzelnen Chemokin-Liganden ließ sich am Basenpaarleiter feststellen und entsprach jeweils den theoretisch zu erwartenden Längen (**Tabelle 6**).

**Tabelle 6:** Erwartete Fragmentlänge der CXCL1 - 10

| CXCL-Bande | Erwartete Fragmentenlänge |
|------------|---------------------------|
| CXCL1      | 232 bp                    |
| CXCL2      | 214 bp                    |
| CXCL4      | 105 bp                    |
| CXCL5      | 239 bp                    |
| CXCL8      | 180 bp                    |
| CXCL9      | 163 bp                    |
| CXCL10     | 248 bp                    |
| CXCL12     | 221 bp                    |
| CXCL13     | 220 bp                    |
| GAPDH      | 503 bp                    |

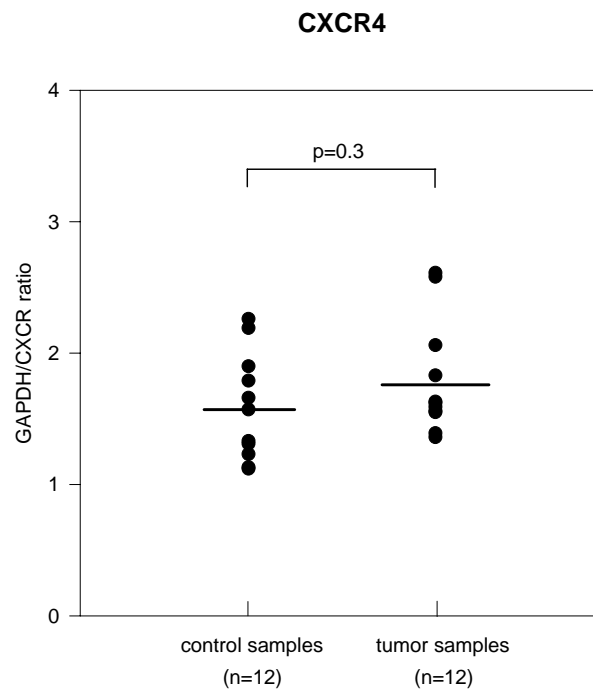
Die repräsentative Darstellung in **Abbildung 4** verdeutlicht Differenzen im CXCL-Expressionsmuster zwischen Tumor und Normalgewebe. Insbesondere CXCL12 sind vermehrt, CXCL13 vermindert in Tumorproben nachweisbar.

### 3.6. Analyse der Ergebnisse

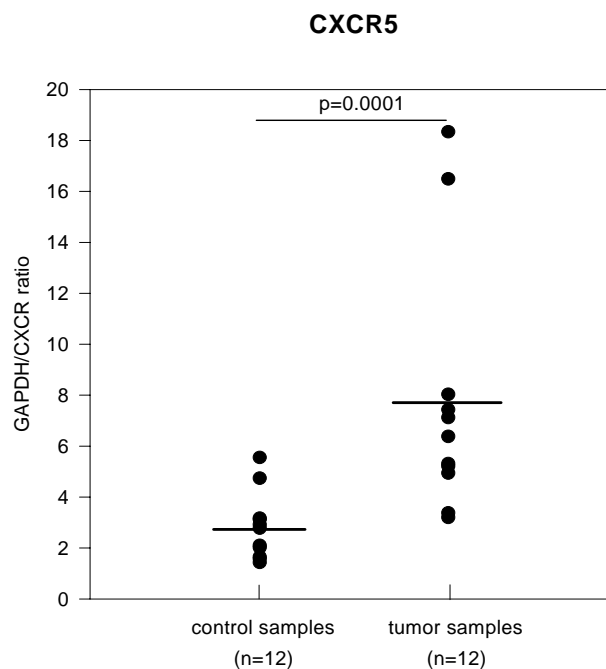
#### 3.6.1. Statistische Auswertung der CXCR-Expression in normalen versus bösartigen Gewebeproben der Prostata

Die relevanten CXCR-Abweichungen sind nachfolgend abgebildet.





**Abbildung 5:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCR4 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

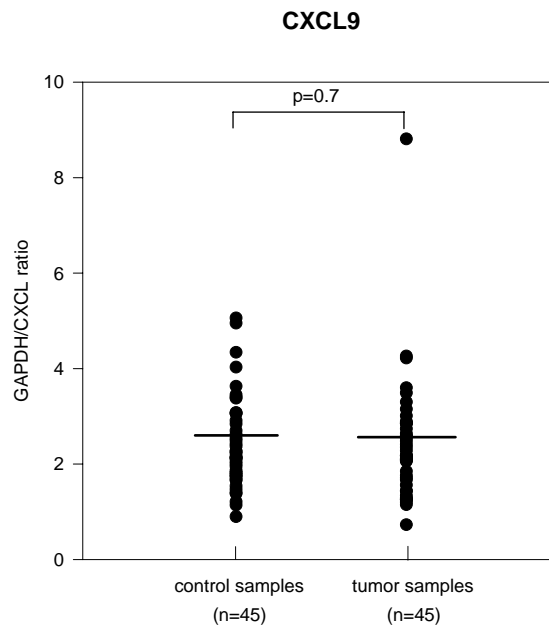


**Abbildung 6:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCR5 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

In den **Abbildungen 5 und 6** wurden Gewebeproben von 12 Patienten untersucht. Die Bandenintensität der GAPDH wurde in Relation zur Stärke der CXCR4- und CXCR5-Bande gesetzt. Die Bandenintensität entspricht der relativen Leuchtstärke (Pixelzahl) pro  $\text{mm}^2$ , die mit Hilfe des Programms Molekular Analyst 1.0; (*Biorad*) ermittelt wurde. Aufgrund des Rechenvorgangs zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Aktivität/Menge, nämlich die Bestimmung des Quotienten aus GAPDH/CXCR, bedeutet eine Reduktion des Quotienten eine Zunahme, eine Erhöhung des Quotienten eine Abnahme des CXCR-Spiegels. **Abbildung 5** zeigt einen dezenten Anstieg des GAPDH/CXCR-Quotienten, gleichzusetzen also mit einer dezenten Reduktion der CXCR4-kodierenden mRNA im Tumorgewebe. Die statistische Analyse ergab jedoch keine hinreichende Signifikanz ( $p = 0,3$ ). Auch die CXCR6-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen Tumor und Normalgewebe (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz ergab sich eine statistisch signifikante Erhöhung des GAPDH/CXCR5-Quotienten, gleichzusetzen mit einer statistisch signifikanten Erniedrigung der CXCR5-kodierenden mRNA im Tumorgewebe (**Abb. 6**). Die berechnete Signifikanz betrug in diesem Fall  $p = 0,0001$ . Dies zeigt an, dass insbesondere die Änderung der CXCR5-Expressionsdichte im Verlaufe des Tumorwachstums eine wichtige Rolle spielen kann.

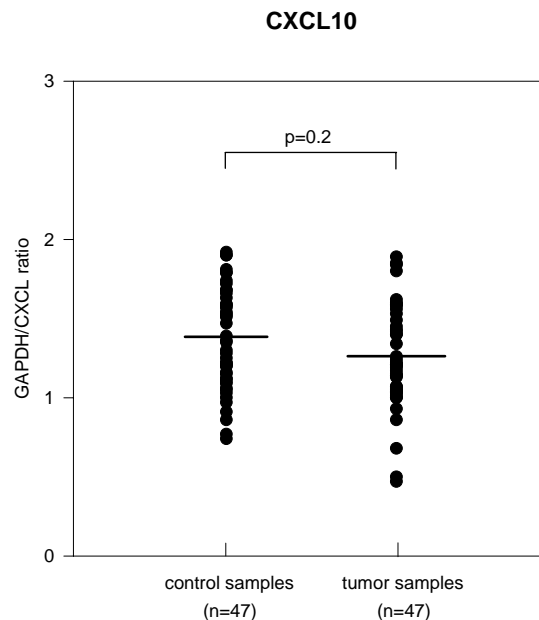
### **3.6.2. Statistische Auswertung der CXCL-Expression in normalen versus bösartigen Gewebeproben der Prostata**

Im Folgenden werden die relevanten RNA-Expressionsveränderungen des CXCL-Chemokinprofils in den Gewebeproben vorgestellt und analysiert. Die statistische Bewertung erfolgte analog zur Ermittlung der CXCR-Veränderungen. Die Bandenintensität der einzelnen Chemokin-Liganden wurde in Relation zur Bandenintensität der GAPDH-kodierenden mRNA gesetzt. Zur Auswertung diente das Programm Molekular Analyst 1.0, (*Biorad*). In der Relationsgleichung ist relative Leuchtstärke der GAPDH im Nenner, die relative Leuchtstärke der Chemokine im Zähler gesetzt. Die Resultate sind somit im entgegengesetzten Sinne aufzufassen, so dass ein Anstieg des GAPDH/CXCL-Quotienten mit einer Reduktion, eine Erniedrigung des GAPDH/CXCL-Quotienten mit einem Anstieg der CXCL-kodierenden mRNA gleichzusetzen ist.



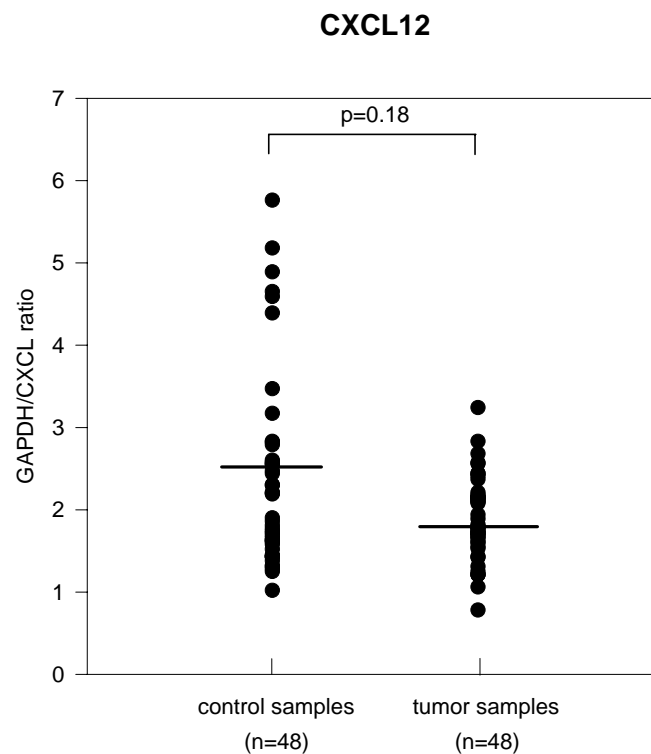
**Abbildung 7:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL9 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

In **Abbildung 7** ist die Änderung des CXCL9-Anteils bei 45 Patienten gezeigt. Die statistische Auswertung über alle Messproben ergab keine statistisch signifikante Differenz in der Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe ( $p = 0,7$ ).



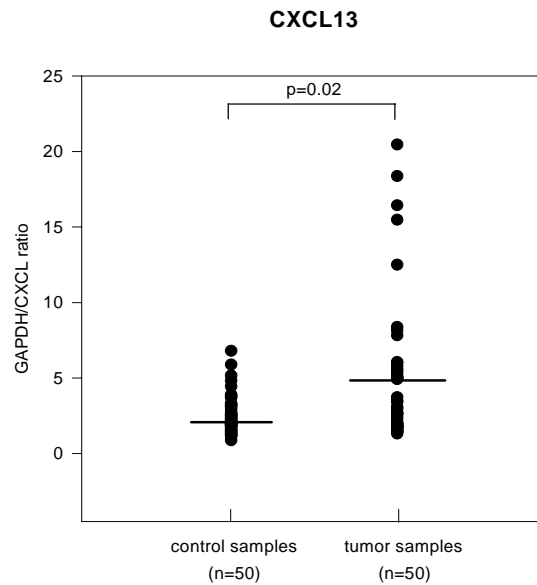
**Abbildung 8:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL10 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

**Abbildung 8** verdeutlicht die CXCL10 mRNA-Expressionsänderung in einem Kollektiv von 47 Patienten. Analog zu CXCL9 ergab die statistische Auswertung über alle Messproben keine signifikante Differenz in der CXCL9-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe ( $p=0,2$ ).



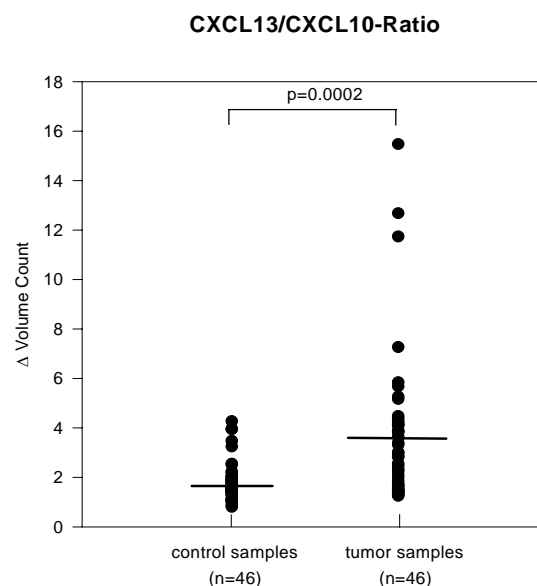
**Abbildung 9:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL12 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

**Abbildung 9** demonstriert den Anteil an CXCL12 kodierender mRNA bei einer Gruppe von 48 Personen. Die Trendanalyse ergibt das gehäufte Auftreten eines erhöhten CXCL12-Spiegels im Tumormaterial. Gleichzeitig lassen sich jedoch auch Überschneidungen zwischen Tumor und Normalkollektiv beobachten. Die beobachteten Differenzen erwiesen sich somit nach der statistischen Auswertung als nicht signifikant ( $p = 0,18$ ).

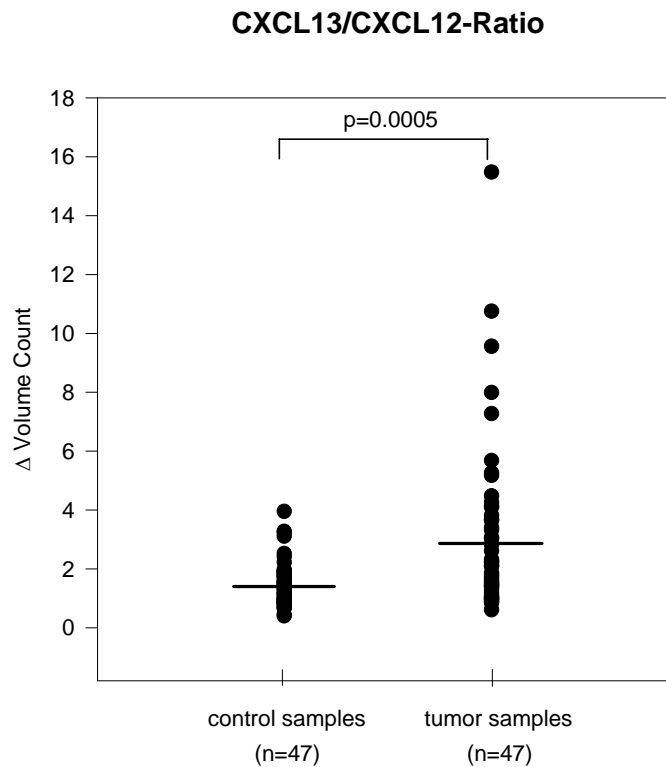


**Abbildung 10:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL13 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

**Abbildung 10** präsentiert die zusammenfassende Darstellung der CXCL13 mRNA-Expression, ermittelt an 50 Patienten. In einer hinreichend großen Anzahl an Tumorproben konnte eine Reduktion der CXCL13 mRNA nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Differenz von  $p = 0,02$ .



**Abbildung 11:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression in Bezug auf die CXCL13/CXCL10-Ratio in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata



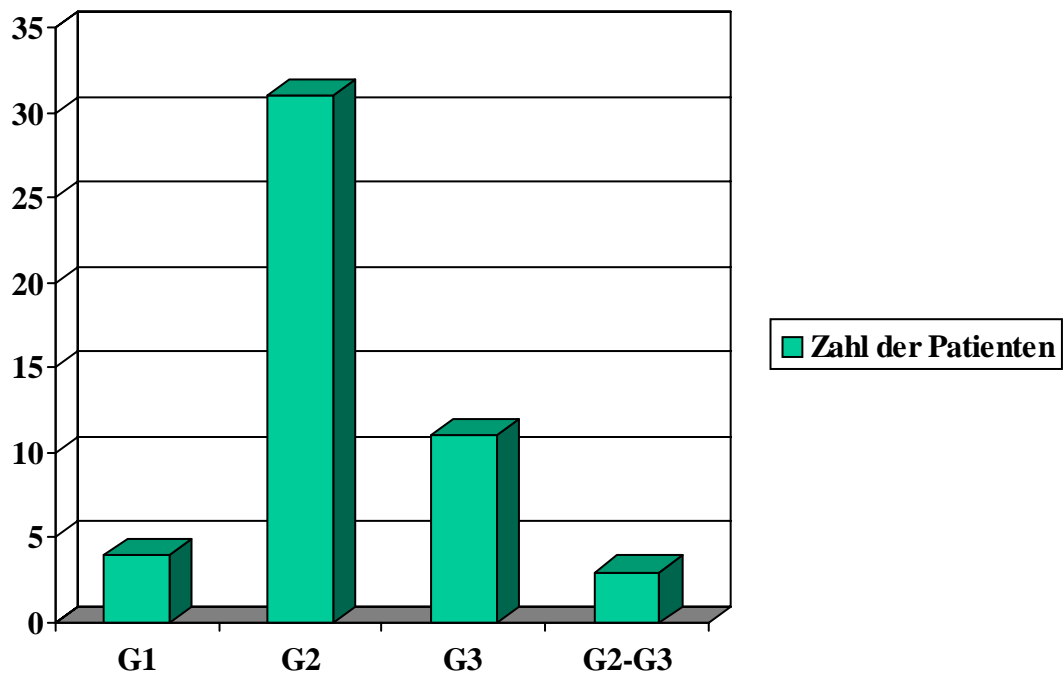
**Abbildung 12:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression in Bezug auf die CXCL13/CXCL 12-Ratio in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata

Die Einbeziehung zweier Parameter in die statistische Analyse unter Berücksichtigung der CXCL13 mRNA Expression führte zur deutlichen Erhöhung der Signifikanz. Dies war offensichtlich insbesondere unter Berücksichtigung der CXCL13- und CXCL10-Expression sowie unter Berücksichtigung der CXCL13- und CXCL12-Expression. **Abbildungen 11** und **12** demonstrieren die respektiven Änderungen der mRNA-Expression, ermittelt aus der Ratio von CXCL13/CXCL10 bzw. CXCL13/CXCL12. Die relative Leuchtstärke des Haushaltsgens GAPDH wurde in der Rechnung berücksichtigt. Die Einbeziehung zweier Parameter in die Gleichung erlaubte jedoch die mathematische Kürzung des GAPDH-Wertes. Der Quotient aus CXCL13/CXCL10 erhöhte sich in den untersuchten 46 Tumorgewebeproben hoch signifikant ( $p = 0,0002$ ). Die Verhältnisgleichung zwischen CXCL13/CXCL12, ermittelt an 47 Patienten, erhöhte sich ebenfalls hoch signifikant im Karzinomgewebe ( $p = 0,0005$ ), verglichen jeweils mit den Normalproben.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich eine Prostatakarzinomzelle im Vergleich zum Normalgewebe über eine veränderte Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren definiert. Die hochsignifikante Erhöhung des CXCL13/CXCL10- und des

CXCL13/CXCL12-Quotienten belegt, dass der Veränderung eines größeren CXC-Kollektivs mehr Bedeutung zukommt als Veränderungen eines einzelnen Chemokin-Ligandes und/oder Rezeptors. Offensichtlich ist also die Modulation eines komplexen Chemokin-Profiles für die Tumormalignität des Prostatakarzinoms von größerer Relevanz, als die Veränderung eines einzelnen Chemokins.

### 3.6.3. Betrachtung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Tumorstadiums

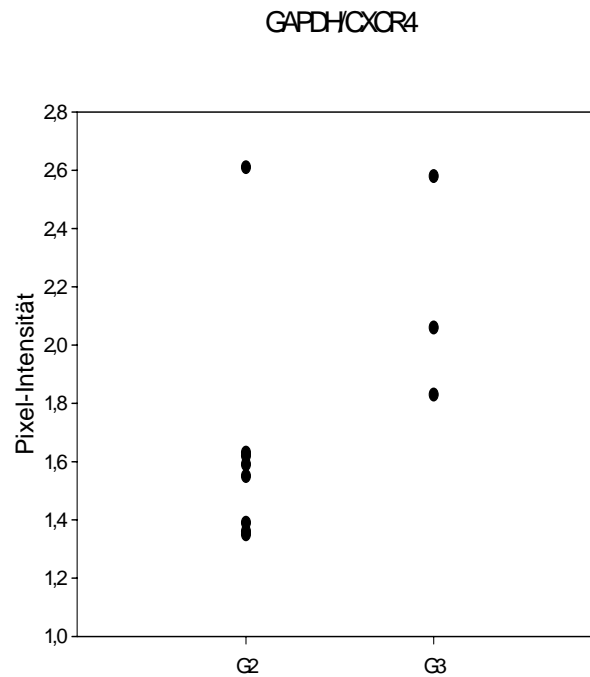


**Abbildung 13:** Darstellung der Verteilung der Zahl der untersuchten Patienten und des histopathologischen Gradings (G) des Prostata Tumors

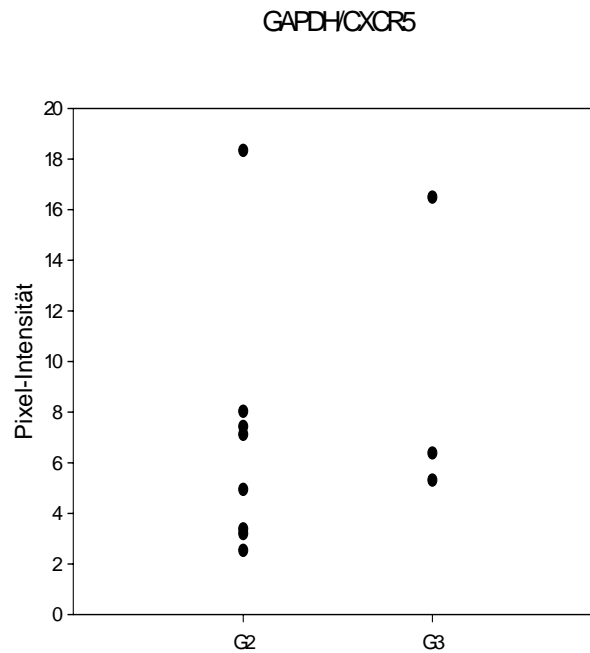
**Abbildung 13** verdeutlicht das Verteilungsmuster der Patienten. Demnach ordneten sich die meisten Patienten zu der Gruppe mit einem mäßig differenzierten Prostatakarzinom (G2, mäßige Anaplasie) ein. Gehäuft präsentiert sich auch die Anzahl an Patienten mit einem schlecht differenzierten Karzinom (G3, ausgeprägte Anaplasie) der Prostata.

Die genaue Verteilung der Zahl der Patienten in Relation zu ihrer Tumorklassifikation ist in **Tabelle 7** im Anhang angegeben.

### 3.6.4. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf das histopathologischen Grading (G) der Patienten



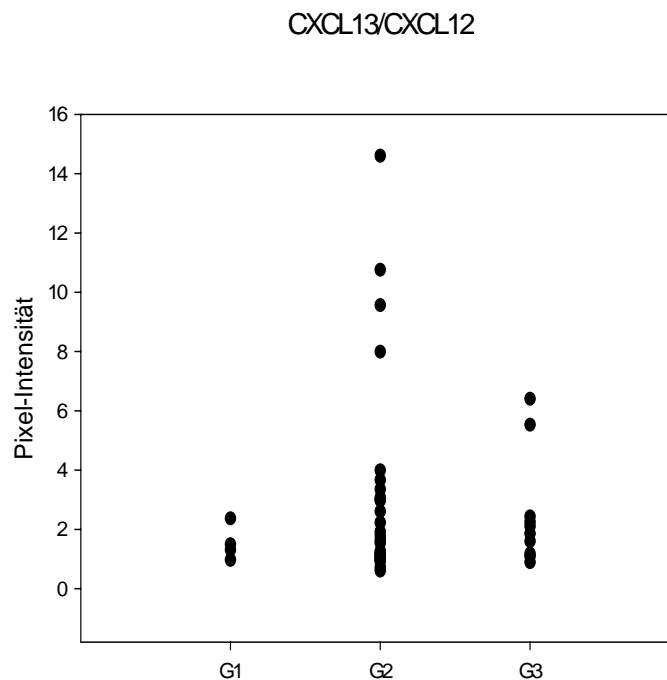
**Abbildung 14:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben



**Abbildung 15:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben



Die nachfolgenden Analysen basierten auf dem Postulat einer möglichen Abhängigkeit der CXCR-Expression vom Tumorstadium. Einbezogen wurden solche Proteine, die bereits am Gesamt-Patientenkollektiv statistisch evaluiert worden waren. In **Abbildungen 14** und **15** ist die Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zur Leuchtstärke der CXCR4- und CXCR5-Bande in Bezug auf das histopathologische Grading dargestellt. Entsprechend der Patientenverteilung bezieht sich die Mehrzahl der Daten auf Patienten im Stadium G2. Insbesondere die Expression von CXCR4 kodierender mRNA scheint sich in Abhängigkeit vom Grading zu reduzieren. Generell ist jedoch eine ausgeprägte Streuung der Bandenintensität zu verzeichnen. Eine signifikante Differenz lässt sich, auch auf Grund der geringen Fallzahl nicht nachgewiesen. Die Intensität der CXCR5-kodierenden mRNA ändert sich weder tendenziell noch in statistisch relevanten Mengen.

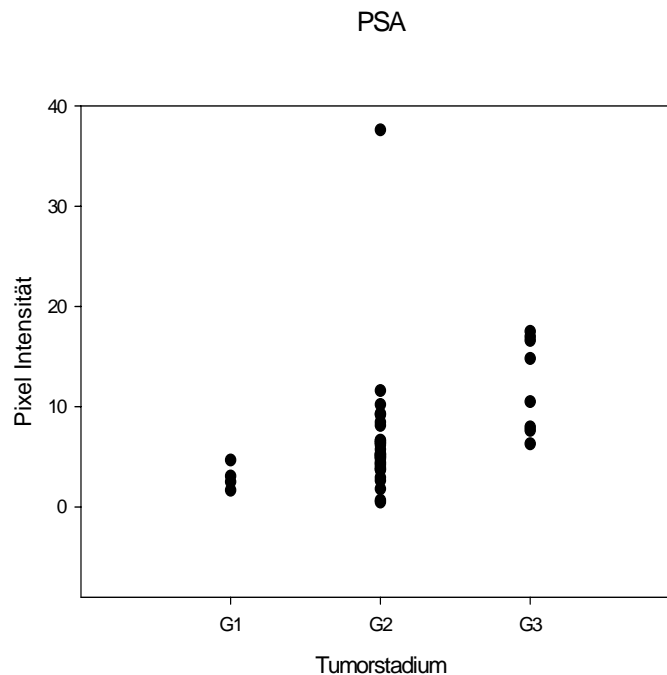


**Abbildung 16:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben

Die **Abbildung 16** stellt die relative Leuchtstärke der Banden dar, errechnet aus dem Quotienten CXCL13/CXCL12 und in Bezug gesetzt zum Grading der Patienten mit Prostatatumor. Es lässt sich ableiten, dass insbesondere im Stadium G2 Tumor Gewebeproben sich über eine vermehrte CXCL13/CXCL12-mRNA-Aktivität charakterisieren. Obwohl

jedoch eine Zunahme der Genexpression gehäuft in diesem Stadium auftritt, lässt sich auf Grund der breiten Streuung der Trend nicht statistisch signifikant belegen.

Die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut gibt wesentlichen Aufschluss über das Vorhandensein neoplastischer Zellen bzw. Entwicklung des Prostatakarzinoms. Entsprechend wurden PSA-Spiegel in dieser Untersuchung als positive Kontrolle berücksichtigt und in die statistische Auswertung integriert.

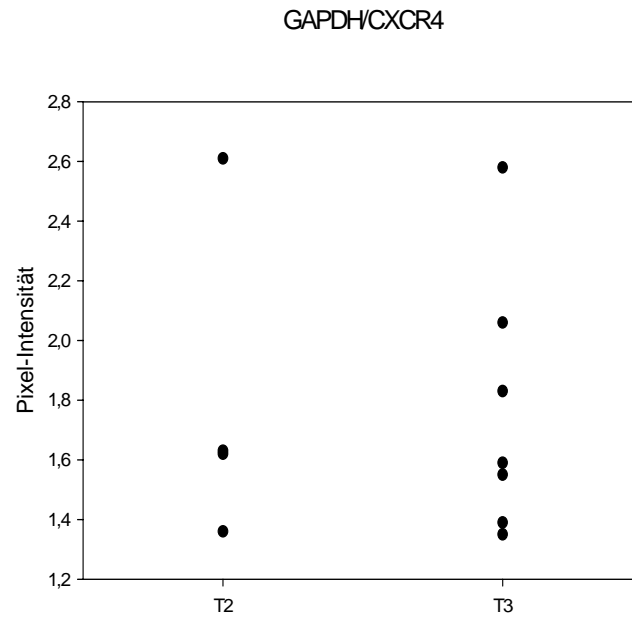


**Abbildung 17:** Darstellung der Abhängigkeit des präoperativen PSA-Wertes unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben

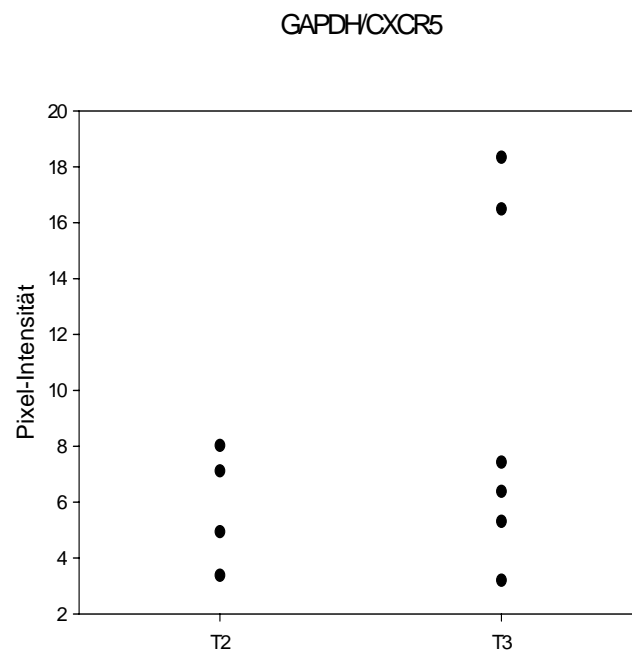
In **Abbildung 17** wird der präoperative PSA-Wert der Patienten in Zusammenhang mit dem Tumorstadium des Prostatakarzinoms gebracht. Es zeigte sich eine zunehmende mittlere Erhöhung des PSA-Wertes (angegeben in ng/ml) von Stadium G1 zu G3, die also mit der Enddifferenzierung des Karzinoms korreliert.

### **3.6.5. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf die Invasivität (T) des Prostatatumors**

Die Beurteilung der Tumorinvasivität (T) gehört zu den wichtigsten Kriterien der klinischen TNM-Klassifikation zur Beurteilung eines Tumors. Sie beschreibt die Ausbreitung und das Eindringen eines Tumors.

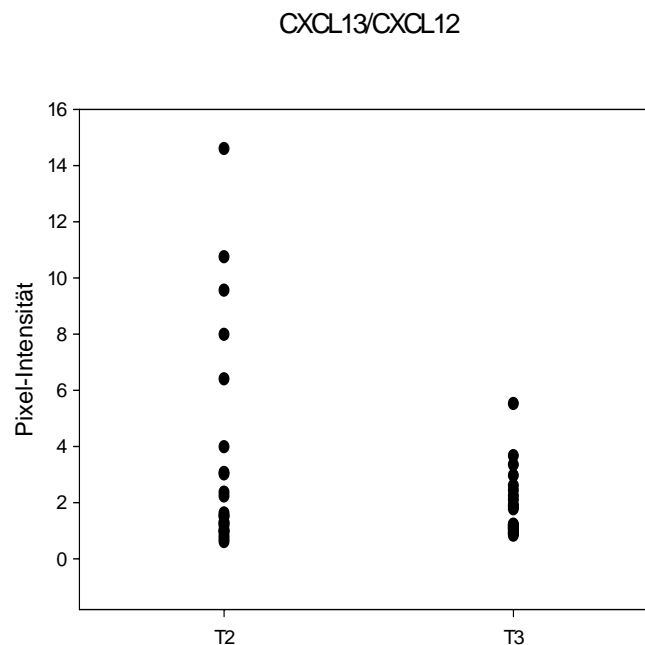


**Abbildung 18:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeproben.



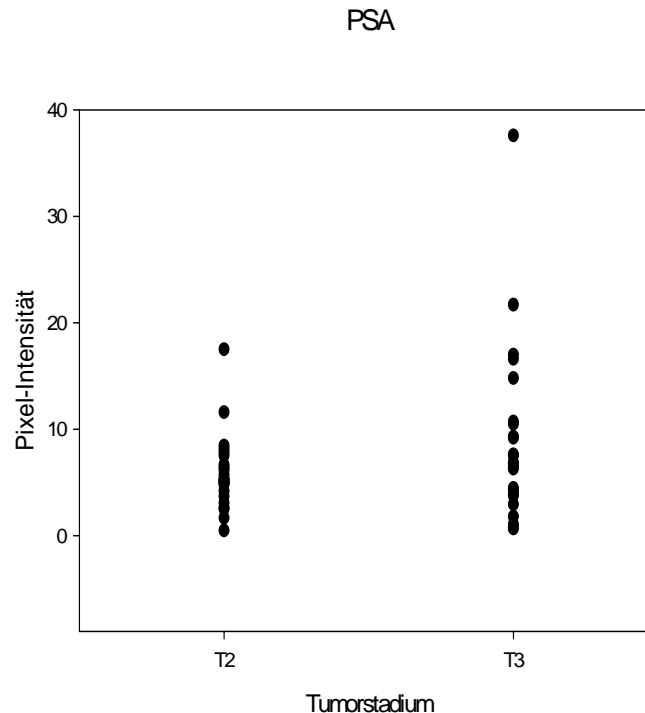
**Abbildung 19:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeproben

In **Abbildung 18** und **19** sind die Leuchtstärken der CXCR4 und CXCR5 mRNA gezeigt. Sämtliche Werte sind in Relation zur Leuchtstärke der GAPDH-Bande gesetzt. Als Beispiel wird die Änderung der CXCR4- und CXCR5-Expression in Abhängigkeit vom T2 und T3-Stadium des Prostata Tumors präsentiert. Bei T2 ist der Tumor auf die Prostata begrenzt, bei T3 ist die Prostatakapsel vom Karzinom durchbrochen. **Abbildung 18** demonstriert keine sichere Korrelation zwischen CXCR4-Genexpression und steigende Tumorinvasivität. Berücksichtigt werden muss dabei die geringe Fallzahl von T2 Prostatakarzinomen, die eine exakte statistische Auswertung nicht gestattet. **Abbildung 19** zeigt eine mittlere Zunahme der GAPDH/CXCR5-Expression (entsprechend einer Reduktion der CXCR5-Intensität) mit steigender Tumorinvasivität des Tumors von T2 zu T3. Aufgrund der geringen Fallzahl lässt sich der Befund nicht statistisch absichern.



**Abbildung 20:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeproben.

In **Abbildung 20** sind die Bandenintensitäten von CXCL13 zu CXCL12 im Bezug auf die Tumorklassifikationen T2 und T3 dargestellt. Eine Reduktion der CXCL13/CXCL12-Intensität in Abhängigkeit vom invasiven Zustand des Tumors wird offensichtlich.



**Abbildung 21:** Darstellung der Abhängigkeit vom präoperativen PSA-Wert unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeproben

In **Abbildung 21** werden die Befunde mit den PSA-Werten „abgeglichen“. Festzustellen ist eine Zunahme des PSA-Wertes zwischen T2- und T3-klassifizierten Prostatatumoren. Die Streubreite erlaubt jedoch keine statistisch signifikante Absicherung.

### 3.6.6. Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf den Gleason-Score (GS) der Patienten

Im Jahre 1966 wurde von Gleason eine nach mikroskopischen Merkmalen bewertete Bösartigkeitsskala zur Beurteilung von Zeller erarbeitet, die mit der Einteilung des Malignitätsgrades (Grading) von dem TNM-System G1 bis G3 korreliert. Es ist folgende Einteilung bekannt:

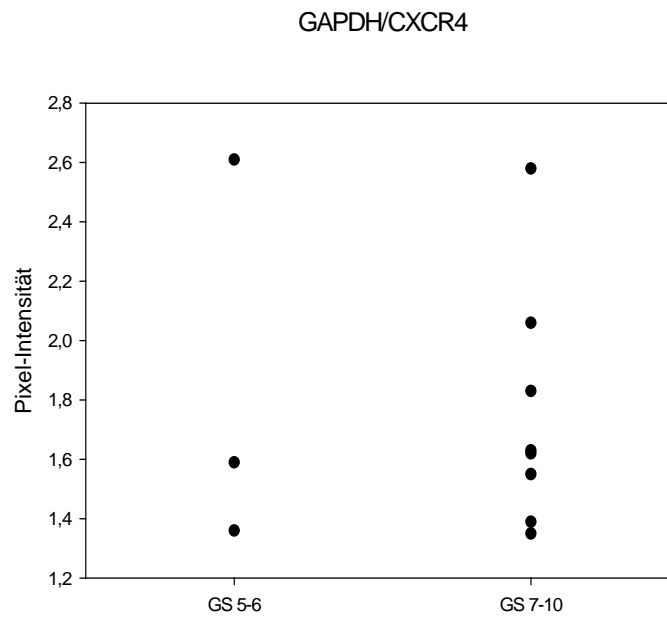
G1 = Gleason-Score 2 - 4

G2 = Gleason-Score 5 - 7

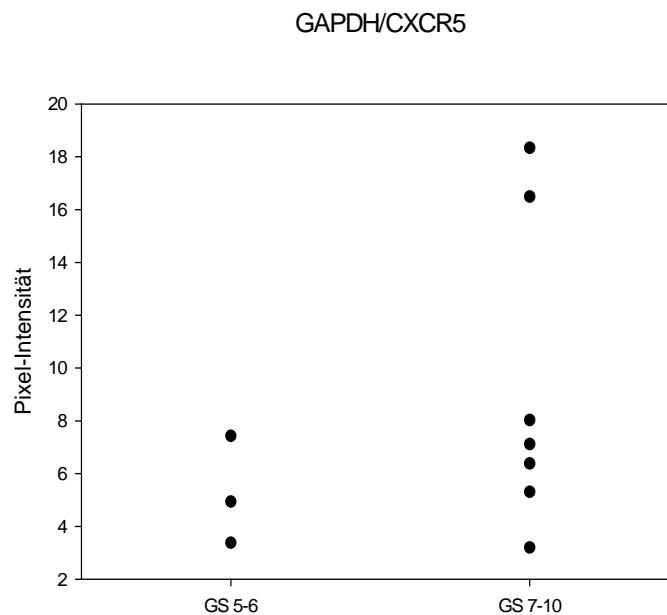
G3 = Gleason-Score 8 - 10

Der Gleason-Score ist ein weiteres Gradmaß für die Bewertung der Karzinomprognose. Die Tumore mit einem niedrigen Gleason-Score haben eine bessere

Prognose als solche mit einem hohen Score. Eine anschauliche Darstellung des Gleason-Score und des TNM-Systems ist in **Tabelle 8** und **9** im Anhang präsentiert.

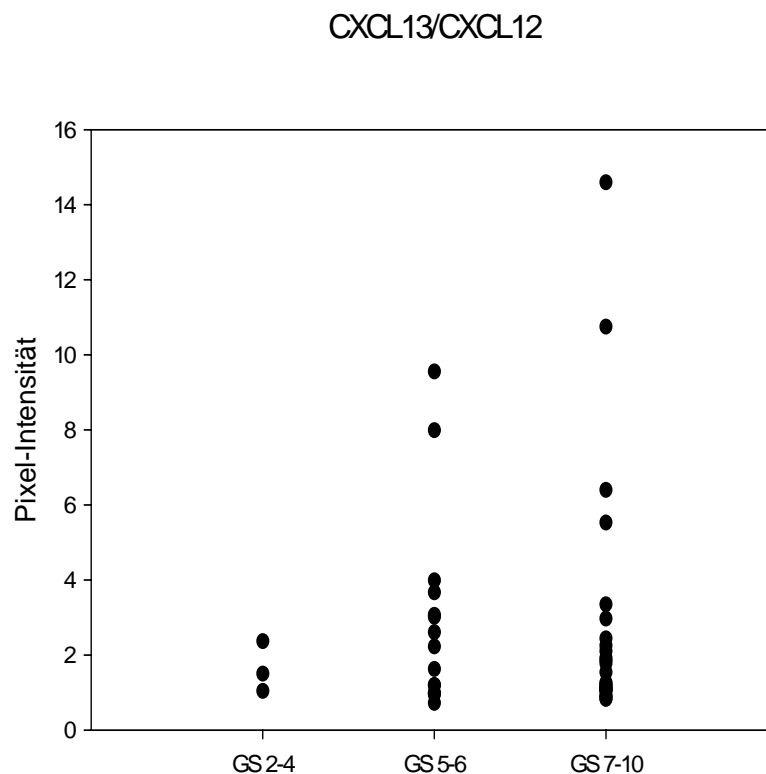


**Abbildung 22:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeproben



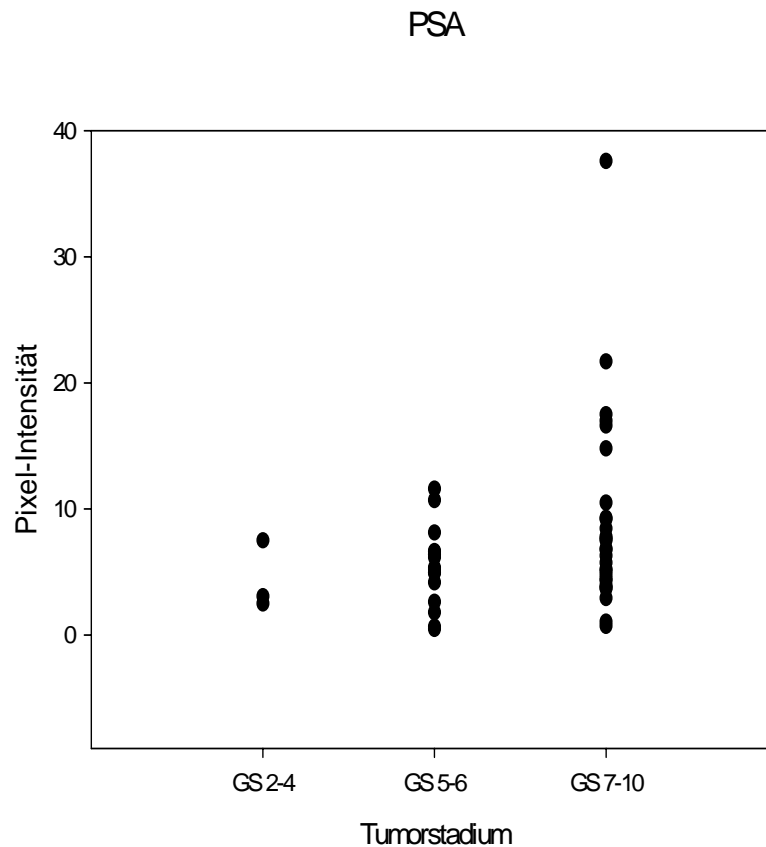
**Abbildung 23:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeproben

**Abbildung 22** und **23** präsentieren die Veränderungen der mRNA-Intensität unter Berücksichtigung der CXCR4- und CXCR5-Rezeptoren. Verglichen wurden Prostatatumore mit einer GS 5-6 und GS 7-10. Dies entspricht einem Grading von G2 und G3. Die relative Leuchtstärke von CXCR4 weist eine breite Streuung auf. Die Mehrzahl der CXCR4-positiven Banden sind bei Prostatatumoren mit GS 7-10 nachzuweisen. **Abbildung 23** zeigt demgegenüber eine deutliche Zunahme der CXCR5-Genexpression mit steigendem Gleason-Score.



**Abbildung 24:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung der Gleason-Score (GS) in Karzinomgewebeprobe

**Abbildung 24** gibt die Verteilung der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden wider, jeweils in Abhängigkeit der verschiedenen Gleason-Score Stadien. Recht anschaulich zeigt sich eine Zunahme des CXCL13/CXCL12-Quotienten in unmittelbarer Korrelation zum Gleason-Score. Gleichzeitig muss eingeräumt werden, dass die Bandbreite der ermittelten Intensitäten breit gestreut ist und sich auch bei Patienten mit einem GS von 7-10 niedrigen CXCL13/CXCL12-mRNA-Aktivitäten messen lassen.



**Abbildung 25:** Darstellung der Abhängigkeit vom präoperativen PSA-Wert der Patienten unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeproben

**Abbildung 25** zeigt eine eindeutige Zunahme der präoperativen PSA-Wertes mit steigendem Gleason-Score der Prostatatumore. Erstaunlicherweise entspricht die PSA-Charakteristik exakt derjenigen der CXCL13/CXCL12-Bestimmung.

Zusammenfassend scheint die Interaktion zwischen CXCL12 und CXCR4, zwischen CXCL13 und CXCR5 eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum der Prostata zu spielen. Die Modifikation eines komplexen Chemokin-Profiles hat für die Tumoralignität des Prostatakarzinoms eine größere Bedeutung als die Veränderung eines einzelnen Chemokins. Die erhöhten präoperativen PSA-Werte zeigen eine positive Korrelation mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium der Prostata.



## 4. Diskussion

### 4.1. Überblick

#### 4.1.1. Die Bedeutung der Chemokin-Rezeptoren bei Tumoren

Die Untersuchungen von Prostatatumorgewebe in dieser Arbeit wurden mittels RT-PCR und Fluoreszenzanalyse (konfokaler Laserscanmikroskopie) durchgeführt. Es wurde ein komplettes CXCL-Expressionsmuster erstellt, welches typische Veränderungen in Bezug auf die verschiedenen Malignitätsstadien des Prostatakarzinoms zeigt. Die Evaluation der CXCR Rezeptoren (**CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6**) diente der Darstellung der Liganden-Rezeptor-Interaktion. Anhand des Datenmaterials lässt sich die Erkenntnis ableiten, dass die Veränderung eines komplexen Chemokin-Profiles für die Tumormalignität des Prostatakarzinoms von größerer Relevanz ist, als die Veränderung eines einzelnen Chemokins. Separat analysiert wurden auch Gewebe in Abhängigkeit vom Tumorstadium, um eine mögliche Korrelation zwischen der Veränderung des Chemokin-Profiles und der Aggressivität des Tumors ableiten zu können.

Die Bedeutung der Chemokin-Rezeptoren wird von verschiedenen Autoren beschrieben. **CXCR1** wurde zum ersten Mal von Holmes *et al* geklont (Holmes *et al.*, 1991). **CXCR2** wurde von Murphy und Tiffany entdeckt (Murphy und Tiffany, 1991). An CXCR1 bindet CXCL8, an CXCR2 binden CXCL1-3 und CXCL5-8 (Murphy, 2002). Alle Chemokine, die an CXCR1 und CXCR2 binden, sind Glu-Leu-Arg-tragende Chemokine. CXCR1 und CXCR2 sind auf allen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen sowie auf manchen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD 56<sup>+</sup>-T-Killer Zellen (NK) exprimiert. Äquivalente Mengen sind auch auf Neutrophilen vertreten (Chuntharapai *et al.*, 1994).

CXCR1 und CXCR2 assoziieren auch mit spezifischen Tumoren. Nachgewiesen ist ihre Rolle in der Progression von Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Haut und reproduktiver Gewebe (Galligan and Howard, 2004).

In dieser Arbeit wurde das intrazelluläre Expressionsverhalten von CXCR1 und CXCR2 beim Prostatakarzinom untersucht. Bislang existierten nur unklare Vorstellungen über den Einfluss der Rezeptoren auf diese Entität. Die eigenen Daten zeigten keine signifikanten Differenzen in der CXCR1 und CXCR2 mRNA-Expression zwischen Normal und Tumorgewebe. Demnach spielt ihre Expression per se keine Rolle im Rahmen der Prostataprogession. Engl und Mitarbeiter (2005) haben intrazelluläre Genaktivität von

CXCR1 und CXCR2 in Prostatatumorzelllinien PC-3, DU-145 und LNCaP gemessen. Übereinstimmend belegen diese Studien, dass die CXCR1 und CXCR2 mRNA nicht von dominanter Bedeutung für die Tumoraggressivität ist (*Engl et al., 2005*). Kim und Mitarbeiter (2001) haben die Expression von CXCR1 und CXCR2 in heterogenen PC-3 humanen Prostatazelllinien-Klonen untersucht. Auch sie kommen zu dem Schluss, dass alle PC-3 Varianten ein gleiches Expressionsmuster beider Rezeptoren besitzen (*Kim et al., 2001*).

Dennoch sind Mechanismen vorstellbar, die zur Tumorgenese und Wachstum beitragen können. Murphy und Mitarbeiter zeigten diesbezüglich, dass die Expression von CXCR1 und CXCR2 bei normalen Prostataepithelzellen an der apikalen und bei Prostatatumorzellen an der nichtapikalen (zytoplasmatischen) Membran vorkommt. Diese Veränderung der Verteilung der Rezeptorexpression korrelierte positiv mit der Proliferation des Prostatatumors. Es lässt sich also ableiten, dass durchaus nicht quantitative, sondern qualitative Rezeptormodifikationen die Tumordifferenzierung und Ausbreitung beeinflussen können (*Murphy et al., 2005*).

Weiterführend stellten *Engl et al. (2005)* die Hypothese auf, dass die Tumordifferenzierung und Malignität durch eine Chemokin-Translokation charakterisiert ist. Um diese Spekulation zu beweisen, wurden Prostatatumorzellen mit dem Differenzierungsagens Valproat behandelt. In der Tat konnten sie nachweisen, dass Valproat zur Redifferenzierung von Prostatatumorzelllinien und zur begleitenden CXCR-Umverteilung führt (*Engl et al., 2005*). Auch korrelierte die Rezeptorumverteilung von CXCR1 und CXCR2 mit der proliferativen Aktivität des Prostatakarzinoms (*Murphy et al., 2005*).

**CXCR3** ist der selektive Rezeptor für die ELR<sup>-</sup>-Chemokinliganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11. CXCR3 ist stark auf IL2-aktivierten T-Lymphozyten exprimiert (*Loetscher et al., 1996*). Alle Chemokine, die an CXCR3 binden, beeinflussen positiv die Migration von T-Lymphozyten und TH1-gesteuerten Entzündungsprozessen (*Murphy, 2002*).

In unseren Untersuchungen wurde mittels konfokaler Laserscanmikroskopie eine homogene Anreicherung der CXCR3-Rezeptoren im Zytoplasma sowie dezenter Akkumulation an den Zell-Zell-Grenzen, zumindest am Beispiel der LNCaP Tumorzelllinie, festgestellt. Generell lässt sich CXCR3 im Zellkulturmodell in reichlichen Mengen an der Tumorzelloberfläche nachweisen (*Engl et al., 2005*). Dennoch scheint dieser Rezeptor am Tumorgeschehen nicht unmittelbar beteiligt zu sein. Zumindest auf mRNA Ebene konnte keine signifikante Differenz in der Expression im Tumorgewebe versus Normalproben festgestellt werden.

Schon früh wurde auf **CXCR4** als relevantes Chemokin verwiesen (*Loetscher et al., 1994*). Loetscher *et al.* (1994) beobachtete die Expression dieses Rezeptors auf Neutrophilen, myeloischen Zellen und vor allem auf T-Lymphozyten. Das CXC Chemokin SDF-1 (CXCL12) wurde nachfolgend als biologischer Ligand von CXCR4 identifiziert (*Bleul, Farzan, Choe et al., 1996; Oberlin, Amara, Bachelierie et al., 1996*). Die grundsätzliche Bedeutung von CXCR4 liegt in der B-Zell-Lymphopoese, der Knochenmarkmyelopoese, in ZNS- und Gefäßsystemprozessen und bei der HIV-Infektion (*Murphy, 2002*). Gleichzeitig wird jedoch auch eine Mitbeteiligung von CXCR4 an Neubildungen und Metastasierung diskutiert. CXCR4 ist der in humanen und interstitiellen Tumorzellen am meisten gefundene Rezeptor. Berichtet wird dabei primär eine Beteiligung bei der Metastasenbildung des kleinzelligen Lungenkarzinoms, des Pankreaskarzinoms, bei Astrogliomen, Myelomen, B-Zell-Lymphomen und chronischer lymphatischer Leukämie (*Ballkwill, 2004*).

Eine besondere Relevanz erlangte daher unsere Untersuchungen zur CXCR4-Expression im Prostatagewebe. Modifikationen in der Expressionsstärke der CXCR4-kodierenden mRNA zwischen Tumor und Normalgewebe konnten jedoch nicht hinreichend signifikant abgesichert werden. Gestützt auf das vorliegende Datenmaterial lässt sich daher nicht postulieren, dass die CXCR4-Expressionshöhe mit dem Malignitätsgrad des Prostata Tumors korreliert. Andere Mechanismen scheinen hier von Bedeutung zu sein. Engl *et al.*, (2006) stellten die These auf, dass weniger die Quantität, als die Interaktion der Rezeptoren mit Integrinen wichtig für die Tumordissemination ist. In ihren Experimenten war die Tumorzelladhäsion nicht von Schwankungen der CXCR4-Oberflächenexpression abhängig. Vielmehr vermittelte CXCR4 die Adhäsion durch  $\alpha 5$  and  $\beta 3$  Integrine (*Engl et al., 2006*).

**CXCR5** wurde erstmalig von Legler *et al.* (1998) identifiziert. Die hohe Bindungsspezifität von BCA-1 (CXCL13) an CXCR5 wurde im gleichen Zeitraum nachgewiesen (*Legler et al., 1998*). Primäre Studien belegten, dass CXCR5 auf Burkitt-Lymphomzellen und B-Lymphozyten stark exprimiert wird (*Dobner et al., 1992*).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit fluorometrischen Messverfahren gezeigt werden, dass CXCR5 an den Zell-Zell-Grenzen der Tumorzellen lokalisiert ist. Interessanterweise ergab sich eine hochsignifikante Reduktion der CXCR5 mRNA-Aktivität in den Tumorgewebsproben. Wir vermuten daher, dass CXCR5 eine wichtige Funktion in der Prostata Tumorentwicklung einnimmt. Die mögliche Bedeutung dieses Rezeptors für Prognose und Diagnostik wird in nachfolgenden Kapiteln näher diskutiert.

**CXCR6** wurde im Jahre 1997 von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt (*Alkhatib et al., 1997; Deng et al., 1997; Liao et al., 1997; Loetscher et al., 1997*). Viele Rezeptoren haben mehrere Liganden, davon abweichend wird CXCR6 nur einen Liganden namens CXCL16 zugeschrieben (*Matloubian et al., 2000; Wilbanks et al., 2001*). CXCR6 ist bevorzugt auf T-Lymphozyten exprimiert. Die Interaktion von CXCR6 und CXCL16 ist vermutlich verantwortlich für die Chemotaxis aktivierter T-Lymphozyten während eines Entzündungsprozesses, das Arrangieren der Immunantwort bei Zell-Zell-Kontakten und das Steuern der Wanderung der T-Lymphozyten in die rote Milzpulpa (*Murphy, 2002*).

In unseren Experimenten haben wir eine dezente Erhöhung der CXCR6-Expression im Tumorgewebe festgestellt, die jedoch statistisch gesehen keine Relevanz besaß. Gestützt auf diese Daten scheint CXCR6 somit keine Rolle bei der Ausbreitung des Prostata Tumors zu spielen. Dennoch darf diese Aussage nicht verallgemeinert werden. Arbeiten von Wagsater und Dimberg (2004) verweisen auf eine potentielle Bedeutung dieses Rezeptors bei colorektalen Tumoren (*Wagsater et al., 2004*). Dies ist in Einklang mit der eingangs aufgestellten Hypothese, dass sich jeder Tumor über sein spezifisches Chemokin-Profil identifiziert und charakterisiert, mit daraus resultierender unterschiedlicher Migrationsfähigkeit in unterschiedliche Zielgewebe.

#### **4.1.2. Die Bedeutung der Chemokine bei Tumoren**

##### **4.1.2.1. Lösliche Chemokine und chemotaktische Zellen**

Die löslichen CXCL Chemokine sind die bindenden Proteine für die Chemokin-Rezeptoren. Ihre Aufgaben sind vielseitig und ihre Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor ist ein komplexer Prozess.

Chemokine haben unterschiedliche Funktionen. Nach der Chemokin-Interaktion mit dem zuständigen Rezeptor werden heterotrimere G-Proteine gebunden und aktiviert. Aktivierte G-Proteine ihrerseits stimulieren verschiedene Signalübertragungsproteine, zum Beispiel Phospholipase-C $\beta$  (PLC $\beta$ )-Isoformen, Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K) und Kinasen der Src-Familie (*Tanaka et al., 2005*). Die Signalübertragung ist für die Steuerung und Determinierung der chemotaktischen Zellen von großer Bedeutung.

#### 4.1.2.2. Bedeutung der CXCL Chemokine bei der Transformation, dem Überleben und Wachstum eines Tumors

Eine bedeutende Aufgabe haben Chemokine und ihre zugehörigen Rezeptoren bei neoplastischen Prozessen. Es ist bekannt, dass Tumorzellen sowohl Chemokine, als auch Chemokin-Rezeptoren exprimieren bzw. freisetzen können. Vermutlich besteht eine unmittelbare Verbindung zwischen Chemokin-Expression, Zelltransformation sowie dem Überleben und Wachstum eines Tumors.

Yang *et al* (2000) haben ermittelt, dass CXCL1 und CXCL8 nicht nur an ihren natürlichen Rezeptor CXCR2, sondern auch an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor binden, der vom Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus-8 (HHV-8) kodiert wird. CXCR2 zeigt eine erhöhte Ähnlichkeit mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor ORF74 oder KSHV-GPRC (Bais *et al.*, 1998). Entsprechend lässt sich eine erhöhte GPRC-Aktivität nach der Koppelung von CXCL1 und CXCL8 feststellen. Die transgenetische Expression dieses Rezeptors bewirkt dabei im Mausmodell angioproliferative Läsionen ähnlich wie bei Kaposi Sarkom (Yang *et al.*, 2000). Die Autoren vermuteten, dass die genannten Chemokine onkogenetische zelluläre Transformationen vermitteln können.

Darüber hinaus können Chemokine auch als autokrine oder/und parakrine Wachstumsfaktoren im Rahmen des Tumorgeschehens auftreten. Als Wachstumsfaktoren vermitteln sie die Teilnahme und Funktion der Zellen im Zellzyklus. Autokrine und parakrine Wachstumsregulation ist in unterschiedlichen Tumorsystemen beschrieben worden. In Karzinomen des Kolons, des Magens, der Leber, des Pankreas, der Haut und der Lunge zeigt zum Beispiel CXCL 8 eine Aktivität als autokrinen Wachstumsfaktor (Fujisawa *et al.*, 2000; Brew *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1998; Takamori *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1996). CXCL8 und CXCR2 werden darüber hinaus auch in Gewebsbiopsien eines Ovarialkarzinoms, Neuroblastoms und Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Nackens exprimiert (Ivarsson *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 1997). All dies untermauert die Hypothese, dass CXCL8 womöglich in autokrinen Stoffwechselprozessen eine Relevanz erfährt.

CXCL1 ist als ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen charakterisiert (Richmond *et al.*, 1986; Bordoni *et al.*, 1990). Auch CXCL2 und CXCL3 sind auffällig bei der Melanozytentransformation und Wachstum (Owen *et al.*, 1997). Alle drei Chemokine binden an denselben Rezeptor CXCR2. Bajetto *et al.* (2001) hat demonstriert, dass die Expression von CXCL12 und CXCR4 zu einer autokrinen und parakrinen Regulation in kultivierten Astrozyten führt. Diese Beispiele bekräftigen die Wichtigkeit der Chemokin-

Rezeptor-Interaktion in der Regulation des Tumorwachstums (*Bajetto et al., 2001a; Bajetto et al., 2001b*).

Chemokine sorgen auch für das Überleben der Tumorzellen. Beispielsweise können CXCL12 und CXCL9 apoptotische Prozesse durch Bindung an CXCR4 und CXCR3 blockieren und somit ungebremstes Wachstum und Überleben neoplastischer Zellen initiieren (*Zhou et al., 2004; Kawada et al., 2004*).

#### 4.1.2.3. Chemokine und die Modulation von Angiogenese und Angiostase

Chemokine beeinflussen unterschiedlich das Tumorwachstum, in dem sie die Angiogenese oder die Angiostase fördern und/oder inhibieren. Diesbezüglich besitzt CXCL8 ein ELR<sup>+</sup>-Motiv an seinem NH<sub>2</sub>-Terminus. Bei CXCL8 wurde zum ersten Mal die stimulierende Wirkung auf die Endothelzellchemotaxis, Proliferation und *in vivo* Angiogenese berichtet (*Koch et al., 1992*). *Strieter et al. (1995)* postulierte die These, dass die Anwesenheit eines ELR-Motivs eine entscheidende Rolle bei der angiogenen Funktion der CXC Chemokine spielt. Und tatsächlich entstand bei der Substitution eines ELR-Motivs in CXCL8 mit den Aminosäuren TVR (Thr-Val-Arg) oder DLQ (Asp-Leu-Gln) ein ELR<sup>-</sup> mutiertes CXCL8, das nun nicht mehr in der Lage war, die Chemotaxis der Endothelzellen *in vivo* zu stimulieren. Im Gegenteil, das mutierte ELR<sup>-</sup>-CXCL8 inhibierte die Angiogenese (*Strieter et al., 1995*). Mittlerweile ist herausgearbeitet, dass CXC Chemokine, die eine ELR-Sequenz (Glu-Leu-Arg) an ihrem NH<sub>2</sub>-Terminus besitzen, angiogene Eigenschaften ausüben und die Chemotaxis von Endothelzellen stimulieren. Demgegenüber stehen CXC Chemokine, die kein ELR-Motiv besitzen, angiostatisch wirken und die Chemotaxis der Endothelzellen verhindern (*Strieter et al., 1995*).

Im Prostatakarzinom wurden signifikante Mengen von CXCL8 in Tumorzellen observiert, aber nicht in normalen oder benignen hyperplastischen Zellen (*Ferrer, Miller, Andrawis et al., 1998*). *Veltri et al. (1999)* haben beobachtet, dass Patienten mit Prostatakarzinom einen erhöhten CXCL8-Serumspiegel aufweisen (*Veltri et al., 1999*). Auch CXCL8 mRNA Spiegel bei Individuen mit radikaler Prostatektomie korrelieren positiv mit fortgeschrittenem pathologischen Stadium (*Uehara et al., 2005*). Auch Antikörper gegen CXCL8, die von Prostatazelllinie PC-3 produziert werden, reduzieren Tumorwachstum und die tumorassoziierte Angiogenese im SCID Mausmodell (*Moore et al., 1999*). Lungenkarzinomzellen produzieren CXCL8, und seine Neutralisation durch spezifische Antikörper unterdrückt die karzinomverknüpfte Angiogeneseaktivität (*Smith et al., 1994*).

Alle diese Beispiele sprechen dafür, dass angiogene Chemokine Tumorwachstum *in vivo* steuern.

Neben CXCL8 zählt CXCL10 zu den intensiv analysierten Chemokinen. CXCL10 wirkt als ELR<sup>-</sup>-Chemokin angiostatisch. Es wird in hohen Mengen von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen produziert. Dabei besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen der Produktion von CXCL10 und Tumorgenese von Lungenkrebszellen im SCID Mausmodell. Therapeutisch inhibiert die intratumorale Injektion von CXCL10 das Tumorwachstum (Arenberg, Kunkel, Polverini *et al.*, 1996). Außerdem verhindert die verstärkte Expression von CXCL10 in Burkitt-Lymphom Zellen das subkutane Tumorwachstum durch Zerstörung der Gefäßkapillaren und nachfolgender Entstehung von Tumornekrosen in „nackten“ Mäusen (Sgadari *et al.*, 1996).

Aufschlussreich ist die Tatsache, dass das ELR<sup>-</sup>-Chemokin CXCL12 die Angiogenese zu stimulieren vermag. CXCL12 löst die Chemotaxis von Endothelzellen aus, indem es an seinen respektiven Rezeptor CXCR4 auf diesen Zellen bindet (Gupta *et al.*, 1998).

Insgesamt lassen sich somit die CXC Chemokine in Aktivatoren oder Inhibitoren der Angiogenese einordnen. Im „Normalzustand“, d. h. in physiologisch intakten, differenzierten Zellen wird durch ein ausgeglichenes Netzwerk von angiogenen und angiostatischen Regulatoren eine sensitive Balance eingehalten, die vermutlich in den verschiedenen Karzinomen gestört ist. Auffallend ist die Tatsache, dass die Balance der von Tumoren produzierten ELR<sup>+</sup>- und ELR<sup>-</sup>-Chemokine zugunsten der Angiogenese verändert wird. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, lässt sich konsequenterweise durch Analyse des CXC-Profiles Differenzierungsgrad und Invasivität eines Karzinoms ableiten (Moore *et al.*, 1998).

#### 4.1.2.4. Chemokine und die Tumor-Leukozyten-Interaktion

Chemokine steuern die Interaktion zwischen Tumoren und immunkompetenten Leukozyten. Viele Tumor- oder Bindegewebszellen produzieren inflammatorische Chemokine, die eine Mobilisation von Leukozyten in das Karzinomgewebe verursachen können. In der Tat korreliert die Ausdehnung der Makrophageninfiltration und die Lymphknotenmetastasen mit der Menge der CCL5/RANTES Expression in Brustkarzinomzellen (Luboshits, Shina, Kaplan *et al.*, 1999). Desgleichen besteht eine positive Abhängigkeit zwischen der CCL-2/MCP-1-Expression und der Makrophageninfiltration, der Tumorangiogenese und -invasion im Oesophaguskarzinom (Ohta, Kitada, Tanaka *et al.*, 2002).

#### 4.1.2.5. Chemokine und die lokale Tumorinvasion

Eine weitere Aufgabe spielen die Chemokine bei der lokalen Tumorinvasion. Tumorzellen können Matalloproteinasen (MMP) und andere Protease-Enzyme produzieren, die die Invasion durch die Extrazelluläre Matrix vermitteln (*Vihinen et al., 2002*). Spezifische Chemokine scheinen die Synthese und Sezernierung der MMP zu triggern. So induziert CXCL8 in Melanomzellen die Transkription von Genen, die MMP-2 kodieren. Daraus resultiert eine erhöhte Invasivität der Tumorzellen durch die Extrazelulläre Matrix hindurch (*Luca et al., 1997; Bar-Eli et al., 1999*). Inoue *et al.* (2000) haben beschrieben, dass die erhöhte CXCL8-Expression in Androgen-abhängigen Prostatatumorzellen zu einer Zunahme der Invasivität dieses Tumors bei Mäusen führt (*Inoue et al., 2000*).

#### 4.1.2.6. Chemokine und die Tumormetastasierung

Chemokine besitzen eine ausgedehnte Fähigkeit, die Tumorinvasion und Metastasenbildung zu beeinflussen. Obwohl nicht alle Tumorentitäten *in vitro* Chemokin-Rezeptoren exprimieren und in Richtung eines Chemokin-Gradienten wandern können, besteht kein Zweifel darüber, dass Chemokine und ihre Rezeptoren *in vivo* die Tumorzellmigration beeinflussen.

Muller *et al.* (2001) haben darauf aufmerksam gemacht, dass gewisse Chemokin-Rezeptoren die Tumormetastasierung in spezifische Zielorgane steuern können. Dies gilt insbesondere für den CXCR4. CXCR4 ist nachweislich in Mammakarzinomgewebe stärker exprimiert als in normalem Brustgewebe. Interessanterweise ist sein respektiver Ligand CXCL12 in verschiedenen Geweben wie Lymphknoten, Knochenmark, Lunge stark angereichert, den bevorzugten Metastasierungsorganen der Mammakarzinomzellen (*Muller et al., 2001*). Experimentell konnte die Verbindung zwischen CXCL12 und zielgerichteter Wanderung CXCR4-positiver Tumorzellen eindrucksvoll untermauert werden. So vermögen Mammakarzinomzellen *in vitro* entlang eines CXCL12 Gradienten wandern. Die Metastasierung zu Lymphknoten und Lungen in SCID Mäusen konnte ferner mit Hilfe von neutralisierenden CXCR4-Antikörpern inhibiert werden (*Muller et al., 2001*). Der an CXCR4 bindende Ligand CXCL12 besitzt jedoch nicht nur eine wichtige Funktion in der Chemotaxis, sondern reguliert auch Tumorwachstum und Cytokinesekretion (*Zlotnik, 2004; Balkwill, 2004*).



Die Chemokine CCL19/ELC und CCL21/SLC binden an den Rezeptor CCR7. Diesem wird eine wichtige Funktion bei der Tumormetastasierung in Lymphknoten zugeschrieben. In der Tat werden diese beide Liganden auf Venulenendothelzellen und lymphatischen Endothelzellen in Lymphknoten exprimiert (*Miyasaka et al., 2004*). In Übereinstimmung haben Wiley *et al.*, (2001) beobachtet, dass CCR7-positive B16 Melanomzellen durch Blut- und Lymphkapillaren in die Lymphknoten metastasieren (*Wiley et al, 2001*). Zugleich erlaubt die CCR7-abhängige Migration der Tumorzellen in die Lymphknoten eine Aussage über die Aggressivität des Tumors. Tatsächlich bilden CCR7-positive Magenkarzinomzellen primär Lymphknotenmetastasen. Patienten mit nachgewiesenen CCR7-positiven Krebszellen besitzen eine schlechtere Prognose als solche mit einem CCR7-negativen Karzinom (*Mashino, Sadenaga, Yamaguchi et al, 2002*).

Bezüglich des Prostatakarzinoms wird CXCR4 in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert. Der Ligand CXCL12 induziert die transendotheliale Chemotaxis und Adhäsion der Tumorzellen zu Osteoklasten im Knochen (*Keller et al., 2001*). Alle diese Beispiele betonen, dass die Chemokine die gerichtete Metastasierung von Tumorzellen in ihre spezifischen Zielorgane steuern können.

#### **4.1.2.7. Chemokine und die *in vivo* Extravasation**

Die löslichen Chemokinproteine erreichen ihre Wirkung durch Diffusion *in vivo*. Sie können an Glykosaminoglykane wie zum Beispiel Heparinsulfat binden (*Kushert, Coulin, Power et al., 1999*). Gefäßendothelzellen exprimieren solche Glykosaminoglykane, die mit verschiedenen Chemokinen agieren, eine Voraussetzung für die Leukozytenadhäsion und Extravasation durch die Blutkapillaren (*Rot et al., 2004*).

Chemokine können zusätzlich die Leukozytenadhäsion auf Endothelzellen durch Integrine vermitteln. Somit wird auch die Extravasation ins Gewebe erreicht. Man vermutet, dass nach diesem Muster auch die Extravasation von Tumorzellen abläuft (*Balkwill, 2004*).

## **4.2. CXCR-Expression beim Prostatakarzinom**

Die eigenen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Expression der CXCR-Rezeptoren CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 und CXCR6 in normalem versus Tumorgewebe.

Als Ergebnis wurde ein unterschiedliches Verhalten der CXCR in den Gewebeproben evident. Charakteristisch erscheinen die Reduktion von CXCR4- und CXCR5-mRNA und die Zunahme der intrazellulären CXCR6-mRNA im Tumorgewebe, verglichen zu den Kontrollen. Die übrigen CXC Rezeptoren CXCR1-3 scheinen bezüglich ihrer quantitativen Expressionsstärke nicht unmittelbar an der Tumorgenese beteiligt zu sein. Es muss zudem eingeräumt werden, dass die Änderungen des CXCR4 nicht als signifikant eingestuft werden können. Aufschlussreicher erwies sich aber die Tatsache, dass CXCR5 im Tumorgewebe eindeutig erniedrigt war. Ein Umstand, der bei der nachfolgenden Diskussion zu berücksichtigen ist.

#### 4.2.1. Der CXCR4-Rezeptor

Mittels RT-PCR wurde ein Trend zur CXCR4-Reduktion im Tumor festgestellt, ein Befund, der jedoch nicht statistisch abgesichert werden konnte. Die mikroskopische Analyse am Zellpräparat verdeutlichte eine Oberflächenverteilung des Rezeptors entlang der Tumorzellmembran, als auch eine intrazelluläre Akkumulation. Dies lässt vermuten, dass dieser Rezeptor in intra- und interzellulären Prozessen involviert ist.

Verschiedene Berichte beschreiben die Rolle des CXCR4-Rezeptors und dessen Liganden CXCL12 bei der Tumorprogression. CXCL12 und CXCR4 regulieren die Blutgefäßbildung, das Zellwachstum und die maligne Entartung (*Zlotnik and Yoshie, 2000; Balkwill, 2003; Kulbe et al., 2004*).

Die CXCR4-CXCL12-Achse scheint insbesondere die gerichtete Metastasierung in die Lunge, Leber, Knochenmark und womöglich Gehirn zu fördern (*Zlotnik, 2004*). Nachgewiesen ist ein Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und der Dissemination von Prostatatumorzellen in den Knochen (*Taichman et al., 2002*). *Murakami et al. (2002)* haben die funktionelle Bedeutung der CXCR4-Rezeptoren für die Metastasierungsprozesse dargelegt. In einem Melanom-Mausmodell zeigten CXCR4-transfizierte Zellen im Vergleich zu CXCR4-negativen Zellen eine 10-fache höhere Potenz in die Lunge zu metastasieren (*Murakami et al., 2002*). Inwiefern CXCR4 bei der Metastasierung des Prostatatumors in gleicher Weise eine Rolle spielt, ist nicht genau geklärt.

Die eigenen Ergebnisse ergaben keine statistisch signifikante Erniedrigung der CXCR4 mRNA-Aktivität im Prostatatumor, sodass quantitative Differenzen der Genaktivität nicht ursächlich für die Tumorprogression verantwortlich zu machen sind. Dies schließt notwendigerweise andere Phänomene nicht aus. Eine kürzlich publizierte Arbeit zeigt, dass

die Tumorprogression keine direkte Abhängigkeit vom CXCR4-Spiegel, eher vom CXCL12 Spiegel hat. CXCL12 induziert die erhöhte Tumorzelladhäsion und steigert die Expression von  $\alpha 5$  and  $\beta 3$  Integrinen (Engl *et al.*, 2006).

In einer aktuellen Arbeit untersuchten Engl und seine Mitarbeiter CXCR4 mRNA, Zytoplasmagehalt sowie Oberflächenexpression vergleichend an den 3 Prostatakarzinomzellen PC-3, DU-145 und LNCaP. Anhand von Proliferationsstudien und Adhäsionsversuchen wurden PC-3 und DU-145-Zellen als hoch maligne, LNCaP-Zellen als niedrig maligne eingestuft (Engl *et al.*, 2005). Überraschenderweise wurden CXCR4 an der Oberfläche in höchsten Konzentrationen auf LNCaP nachgewiesen, wohingegen intrazellulär eine erhöhte Akkumulation in DU-145 und PC-3 Zellen auffällig war. Gestützt auf Differenzierungsexperimente stellten die Autoren die These auf, dass eine Verschiebung von CXCR 4 von der Zelloberfläche in das Zytoplasma tumorfördernde Signale aktivieren und die Progression von einem niedrigen zu einem hoch aggressiven Phänotyp begünstigen kann (Engl *et al.*, 2005). Inwieweit das *in vitro* Modell auf die *in vivo* Situation zu übertragen ist, bleibt fraglich. Allerdings haben Murphy und Mitarbeiter (2005) an Patientenproben Verschiebungen (Translokation) von Chemokinrezeptoren (CXCR1 und CXCR2) nachgewiesen, ein Vorgang der mit der Progression des Prostatakarzinoms in Verbindung steht (Murphy *et al.*, 2005). Hart *et al.* (2005) stellte durch immunhistochemischen Färbungen eine starke nukleäre und zytoplasmatische CXCR4-Anreicherung in Prostatatumorzellen fest (Hart *et al.*, 2005). Sun und Mitarbeiter (2003) beobachteten übereinstimmend eine starke zytoplasmatische CXCR4-Lokalisation im Prostatatumor (Sun, *et al.*, 2003).

Die eigenen Aussagen sind insofern limitierend, als sich in den untersuchten Gewebeproben unterschiedliche Mengen an Tumorzellen befanden. Die quantitative, vergleichende Zuordnung wurde dadurch erschwert. Dies zeigt sich insbesondere in der breiten Streuung der mRNA-Aktivität über die gesamte Probenmenge. Dadurch bedingt konnten CXCR4-Differenzen nicht statistisch abgesichert werden. Dies gilt für die komplette Analyse von Tumormaterial versus Normalgewebe, aber auch für die Darstellung der CXCR4-Expression in Relation zu Grading, T-Stadium und Gleason-Score. Obwohl spekulativ ließe sich womöglich im Rahmen einer Einzelzellanalyse eine hinreichende Signifikanz bezüglich der quantitativen CXCR4-Modulation errechnen.

Die Schwierigkeit der CXCR4-Interpretation offenbart sich durch weitere Publikationen, die im Widerspruch zueinander stehen. Nach Mochizuki *et al.* (2004) und anderen Autoren ist der CXCR4-Rezeptor im Prostatatumor im Vergleich zum nicht erkrankten Gewebe deutlich exprimiert (Mochizuki *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2003; Darash-

*Yahana et al., 2004*). Auf mRNA-Ebene detektierte *Sun et al (2003)* eine deutliche CXCR4-Rezeptorexpression in LNCaP und PC-3 Tumorzellen. *Darash-Yahana et al. (2004)* beschreiben hingegen nur eine schwache Expression in denselben Zellen. *Mochizuki et al (2004)* und *Taichmann et al (2002)* referieren über eine starke CXCR4 mRNA-Aktivität in allen drei Prostatakarzinomzellen PC-3, DU-145 und LNCaP (*Mochizuki et al., 2004; Taichman et al., 2002*). Des Weiteren stellten *Mochizuki et al., (2004)* keine CXCR4 mRNA-Expression in normalen Prostatazelllinien fest. Im Gegenteil dazu haben wir eine eindeutige CXCR4 mRNA Präsenz in Tumorgewebe beobachtet. Auch *in vitro* lassen sich Differenzen aufzeigen. *Hart et al. (2005)* demonstriert eine deutliche Präsenz der CXCR4-Rezeptoren an der Zelloberfläche von PC-3 Zellen. *Darash-Yahana et al. (2004)* konnten dies auf der gleichen Zelllinie nicht messen. In unseren Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie haben wir zumindest am Beispiel der LNCaP Tumorzelllinie eine Verteilung der CXCR4-Rezeptoren nicht nur im Zytoplasma, sondern auch an der Zelloberfläche beobachtet.

Auch die Funktion von CXCR4 ist nicht eindeutig geklärt. *Mochizuki et al. (2004)* zeigte, dass Prostatatumorzellen in Richtung des CXCL12-Gradienten migrieren. Im Gegensatz dazu konnten *Darash-Yahana et al. (2004)* die CXCL12-abhängige Migration dieser Zellen nicht messen. Sie postulierten, dass eine CXCR4-Überexpression unmittelbare Auswirkung auf das Tumorwachstum *in vivo* hat. Laut *Sun et al. (2003)* wiederum übt CXCL12 keinen Effekt auf die Proliferation von Prostatatumorzellen aus. Patientenstudien ergaben, dass die erhöhte CXCR4-Expression in Tumorgewebe mit einer geringeren Lebenserwartung verbunden ist (*Sun et al., 2003*). Neuen Daten zufolge vermitteln CXCR4-Rezeptoren die Anbindung von Tumorzellen an ihr Zielorgan über eine vermehrte Aktivität von beta1-Integrinen (*Engl et al., Neoplasia; 2006; im Druck*). CXCR4 würde in diesem Fall nicht direkt in Prozesse der Tumordinvasion eingreifen, sondern vielmehr als Steuerungselement die Integrin vermittelte Tumoradohäsion und -penetration regulieren.

An Mammakarzinomzellen ist nachgewiesen, dass die CXCR4-Aktivierung durch CXCL12 *in vitro* die Aktinpolymerisation, Pseudopodienbildung, Migration und Invasion der Tumorzellen induziert (*Muller et al., 2001*). Die durch Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten hervorgerufenen Veränderungen des Aktinzytoskeletts bewirken charakteristische Veränderung der Zellform mit einer Polarisierung an der Zellperipherie. Eingebunden in den Prozess der Zytoskelett-Umstrukturierung ist die Pseudopodienbildung, die eine zielgerichtete Zellbewegung ermöglicht, inklusive Migration der malignen Zellen durch die Basalmembran und Bildung effizienter Metastasenformationen. In wie weit diese

Verläufe auf den Prostatatumor übertragbar sind, kann nicht abschließend geklärt werden. Vielleicht sind diese Eigenschaften nur typisch für einzelne Tumorentitäten und andere zelluläre Mechanismen zeichnen für die Progression des Prostatakarzinoms verantwortlich.

Zusammenfassend demonstrieren die eigenen Untersuchungen eine mögliche Beteiligung des CXCR4 beim Prostatakarzinom. Die intrazelluläre Expression dieses Rezeptors vermittelt die Invasion und Progression einzelner Tumorzellen. Obwohl keine Korrelation zwischen CXCR4-Aktivität und fortgeschrittenem Tumorstadium festgestellt werden konnte, bleibt die Analyse dieses Rezeptors wichtiger Punkt bei der Erforschung des Prostatakrebses. Die therapeutische Intervention in die CXCR4/CXCL12-Achse könnte neue Möglichkeiten zur Hemmung der Invasionsfähigkeit der Prostatatumorzellen eröffnen.

#### 4.2.2. Der CXCR5-Rezeptor

Weiterhin haben wir die intrazelluläre Expression von CXCR5 zwischen normalem und Tumorgewebe der Prostata verglichen. Die Untersuchungen ergaben eine hochsignifikante Reduktion der mRNA-Expression im Karzinomgewebe. Die konfokale Laserscanmikroskopie am Zellmodell demonstrierte eine Oberflächenverteilung von CXCR5 an den Zell-Zell-Grenzen. Diese Präsenz spricht für eine Beteiligung an interzellulären Vorgängen. Wir nehmen an, dass CXCR5 eine wichtige Aufgabe bei der Prostatatumorprogression spielen könnte.

Die Literatur zeigt die Rolle von CXCR5 in der Homeostase des Immunsystems, bei Infektionen und Entzündungsprozessen auf. Eine Expression von CXCR5 ist auf reifen zirkulierenden B-Zellen, auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dendritischen Zellen beschrieben worden (*Wu and Hwang, 2002; Förster et al, 1994; Saeki et al., 2000; Yu et al., 2002*). CXCR5 wird grundsätzlich für die Steuerung der B-Zellen in den B-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe verantwortlich gemacht. Jedoch lässt sich aufgrund des Auftretens von CXCR5 bei CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten Subpopulationen mutmaßen, dass dieser Rezeptor auch eine Rolle bei der T-Lymphozyten Migration spielt. In den sekundären lymphatischen Organen ist sein Ligand CXCL13 in der B-Zone, aber nicht in der benachbarten T-Zone vorhanden (*Schaerli et al., 2000*). Die T-Lymphozyten exprimieren CXCR5 und wandern entsprechend in die B-Zone, wo CXCL13 produziert wird. Durch die Relokalisation der B-Helfer und T-Lymphozyten von der T- in die B-Zone erwerben sie ihre Immunkompetenz.

Jeder Schritt in der transendotheliale Migration von Lymphozyten ist ein unabhängiger Prozess, dessen Spezifität durch die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen und

Chemokin-Rezeptoren auf den Lymphozyten in den spezifischen anatomischen Strukturen geprägt ist. Diese Migration ist von der Anwesenheit solcher Chemokine abhängig, die eine regionale Selektivität steuern können. Zum Beispiel ist die transendotheliale Migration von B-Zellen in die Lymphknoten ein CXCR5 abhängiger Prozess (*Okada et al., 2002*).

Über die Rolle von CXCR5 beim Prostatakarzinom existieren keine detaillierten Berichte Evidenz. Normale B-Zellen exprimieren CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR6 und CCR7. Viele Autoren verbinden CXCR5 mit verschiedenen B-Zell-Neoplasien. Zum Beispiel untersuchten *Wong und Fulcher* (2004) mittels Flusszytometrie die Expression der oben gelisteten Rezeptoren in verschiedenen B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen. In ihrer Arbeit beschreiben sie eine positive Expression des CXCR5 bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und kleinzelligem lymphozytären Lymphom (SLL) sowie eine negative Expression des CXCR5 in Haarzelleukämien (HCL) (*Wong and Fulcher, 2004*). Dieses Konzept vertreten auch *Trentin und Mitarbeiter* (2004). Sie bestätigen die oben genannten Ergebnisse und fügen zudem eine positive Expression von CXCR5 in Non-Hodgkin Lymphom hinzu (*Trentin et al, 2004*).

Es lässt sich zusammenfassen, dass CXCR5 in verschiedenen B-Zell-Malignitäten eine Rolle spielt. Die Migration normaler und tumoröser B-Lymphozyten wird von diesem Rezeptor gesteuert, offensichtlich auch T-Lymphozyten. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde eine hoch signifikante Reduktion der CXCR5 mRNA-Expression im Tumorgewebe festgestellt. Dieses Phänomen ist bislang nicht beschrieben worden. Welche Rolle CXCR5 bei der Prostataumor-Dissemination spielt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht definitiv aufgeklärt werden. Da CXCR5 mit B- und T-Lymphozyten in Verbindung gebracht wird, könnte CXCR5 hypothetisch eine Rolle in solchen Entzündungsprozessen spielen, die von der lokalen Tumorprogression vermittelt wird.

### **4.3. CXCL-Expression beim Prostatakarzinom**

Mit den eigenen Analysen wurde die Expression der CXC Chemokine **CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13** in normalem und Tumorgewebe der Prostata mittels RT-PCR gemessen. Als bedeutsames Resultat wurde eine Erhöhung der CXCL9-, CXCL10- und CXCL12-kodierenden mRNA im Tumorgewebe beobachtet, bei gleichzeitiger Reduktion der CXCL13-kodierenden mRNA. Die übrigen untersuchten Chemokine zeigten keine signifikanten Veränderungen. Das Verhalten der CXCL12/CXCR4-Expression stand im Vordergrund des Interesses, da diese Interaktion eine

besondere Rolle bei der Progression des Prostata Tumors spielt. Überraschend war zudem die Tatsache, dass offensichtlich auch die CXCR5-CXCL13-Achse in die Tumorgenese mit eingebunden ist. Auffällig war eine hochsignifikante Reduktion der intrazellulären Aktivität von sowohl CXCR5, als auch von seinem Liganden CXCL13 im Prostata Tumorgewebe. Demzufolge lässt sich ableiten, dass die Expression-Abnahme von CXCL13 und CXCR5 in die Progression des Prostatakarzinoms eingebunden ist.

Funktionell lassen sich die Chemokine in zwei Subgruppen - die inflammatorische und die homeostatische - unterteilen. Inflammatorische Chemokine werden von aktivierten Leukozyten und Bindegewebszellen während einer Entzündung sowie auch von verschiedenen Tumorzellen produziert. Sie regulieren die Aktivierung von Effektor-Leukozyten und determinieren die Ausbreitung des Entzündungsinfiltrats. Die homeostatischen Chemokine werden nicht entzündlichen Prozessen zugeordnet. Sie kontrollieren die Navigation der Leukozytenvorläuferzellen während der Hämatopoese im Knochenmark und im Thymus, steuern den zellulären Fluss in die Milz und Lymphknoten und tragen zur Immunüberwachung der peripheren Organe bei (*Ebert et al., 2005*).

Der Verlauf der Zirkulation von Leukozyten vom Blutstrom in das Gewebe beinhaltet die Gefäßwandadhäsion, Extravasation (transendotheliale Migration) und die Wanderung der Zellen ins Gewebe. Der Vorgang der gezielten Migration von Leukozyten ins Gewebe erfolgt durch Aktivierung verschiedener endothelialer Adhäsionsmoleküle wie E- und P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, aber auch durch Chemokine (*Bochner, 2000*). Der erste Schritt in der Migrationskaskade beinhaltet das Rollen der Leukozyten entlang der Endotheloberfläche, primär über Selektine vermittelt. Als Resultat werden die Lymphozyten abgebremst. Sie beginnen sich entlang der Blutgefäßwand zu bewegen. Während dieser Phase kommen die Lymphozyten in Kontakt mit Chemokinen, die auf der Oberfläche des Endothels präsentiert sind. Die Chemokine binden ihren zugehörigen Rezeptor und triggern die Aktivierung von Integrinen, die ihrerseits die feste Adhäsion zwischen Lymphozyten und Endothel vermitteln (*Johnston and Butcher, 2002*). Dies geschieht insbesondere durch eine Erhöhung der Bindungsaffinität der Integrine an ihre jeweiligen Liganden (*Constantin et al., 2000*). Die nachfolgende transendotheliale Migration der Leukozyten findet entlang des Chemokingradienten in das Gewebe statt.

Die an Leukozyten beobachteten Invasionsphasen lassen sich in ihren Grundzügen auch auf die Interaktion von Tumorzellen mit dem Gefäßendothel übertragen. So produzieren Epitheltumorzellen des Ovarkarzinoms Chemokine wie CCL2 und CXCL12. Die Leukozyten werden von den Tumorzellen angelockt und reagieren mit einer gesteigerten Synthese

weiterer Chemokine und inflammatorischer Cytokine. Dies induziert das Anlocken weiterer immunmodulatorischer Zellen insbesondere Th2-Lymphozyten, Typ-2 Makrophagen und prädendritische Zellen. Als Fazit erleichtern die Leukozyten die Tumorprogression durch Produktion von Proteasen, angiogenen Faktoren, Wachstumsfaktoren und immunsuppressiven Cytokinen (*Balkwill, 2004*).

#### **4.3.1. CXCL12-Veränderungen beim Prostatakarzinom**

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurde die Rolle der CXCL12/CXCR4-Interaktion beim Prostataumor ermittelt. Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Zunahme der CXCL12-Aktivität in bösartigen Gewebeproben hin. Weiterhin wurde die CXCL13/CXCL12-Ratio ermittelt und dabei eine hochsignifikante Erhöhung in Prostataumorproben festgestellt. Insgesamt lässt sich daraus postulieren, dass die Analyse mehrerer Chemokine und deren Verhältnis zueinander von größerer klinischer Relevanz ist, als die Fokussierung auf einen einzelnen Chemokin-Liganden. Diesem Konzept folgend wurde die CXCL13/CXCL12-Ratio mit dem histopathologischen Grading (G), der Tumorinvasivität und Gleason-Score (GS) verglichen. In der Tat konnte die Reduktion der CXCL13/CXCL12-Ratio einer steigenden Tumorinvasivität zugeordnet werden.

CXCL12 ist in Lymphomen, Gliomen, Ovar- und Pankreaskarzinomen (*Corcione et al., 2000; Koshiba et al., 2000; Scotton et al., 2002, Zhou et al., 2002*) gefunden worden. Darüber hinaus findet er sich angereichert in metastatischen Zielorganen des Mamma- und Thyreoidkarzinoms, des Neuroblastoms und hämatologischer Malignitäten (*Geminder et al., 2001; Hwang et al., 2003; Muller et al., 2001*).

CXCL12-Chemokine sind ursprünglich als chemotaktische Moleküle für die Leukozyten definiert worden. Vermutlich regulieren CXCL12 Polymerisation und Depolymerisation von intrazellulären Aktinfilamenten mit daraus resultierender Veränderung der Zellform und Etablierung einer Zellpolarisierung unter Ausbildung von Pseudopodien. Die Induktion von Pseudopodien ist in gleichem Maße elementar für die Migration maligner Zellen durch die Basalmembran. Die präsentierten Daten einer CXCL12-Zunahme im Prostataumor lassen sich somit dahingegen interpretieren, als CXCL12 die Bildung von effizienten Metastasenformationen begünstigt, in Kooperation mit dem zugehörigen Rezeptor CXCR4.

Viele Studien sehen tatsächlich einen Zusammenhang zwischen der chemotaktischen Kapazität von Prostataumorzellen und dem CXCL12-Gradienten im Zielgewebe. Wie genau



die Schritte der metastatischen Kaskade durch CXCL12 getriggert werden, lässt sich noch nicht exakt sagen. *Balkwill* (2004) postulierte, dass eine Aktivierung von CXCR4 die gerichtete Chemotaxis der Krebszellen stimuliert und deren Invasion durch das Endothel und EZM erhöht. Die EZM stellt nach heutiger Definition die Gesamtheit der Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden. In den Prozess der Matrixdurchwanderung sind sezernierte Metalloproteinasen (MMP) wesentlich eingebunden. Tumorzellen vermögen diesbezüglich Metalloproteinasen zu synthetisieren und freizusetzen, die für eine gerichtete Invasion durch die EZM verantwortlich zeichnen (*Vihinen et al.*, 2002). MMP lysieren unmittelbar die EZM und sind insofern mit der Malignität und Invasion von Tumorzellen gekoppelt, als ein Anstieg der MMP-Aktivität zur erhöhten Tumordissemination beiträgt (*Westermarck et al.*, 1999). Berichtet wird über eine Aktivierung von MMP-9 und MMP-2 unter CXCL12-Stimulation (*Fernandis et al.*, 2004) oder über die Zunahme ihrer Lyseaktivität nach CXCL12-Exposition (*Perissinotto et al.*, 2005; *Lane et al.*, 2000). Beide Enzyme spielen eine wesentliche Rolle bei der Degradation der EZM (*Itoh und Nagase*, 2002). Somit könnte CXCL12 die Progression des Prostatakarzinoms über freigesetzte MMP beeinflussen.

#### 4.3.2. CXCL13-Veränderungen beim Prostatakarzinom

Erstaunlicherweise wurde eine hochsignifikante Reduktion der intrazellulären CXCL13-Aktivität in Prostatagewebeproben festgestellt. Auch der korrespondierende CXCR5-Rezeptor war signifikant im Tumorgewebe vermindert. Interessant erwies sich auch das Verhältnis einzelner Chemokine zueinander. Berechnet wurden die Quotienten aus CXCL13 zu CXCL10 bzw. aus CXCL13 zu CXCL12. In den beiden Fällen zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der Werte im Karzinomgewebe (CXCL13/CXCL10-Ratio:  $p = 0,0002$ ; CXCL13/CXCL12-Ratio:  $p = 0,0005$ ). Außerdem stellten wir eine Zunahme der CXCL13/CXCL12-Expression mit steigender Invasivität (T) und steigendem Gleason-Score (GS) des Tumors fest. Dabei muss erwähnt werden, dass die CXCL13/CXCL12-Expression bei der Invasivitätsdarstellung im niedrigen Intensitätsbereich liegen. Dies unterstreicht, dass die Modulation mehrerer Chemokine von größerer Bedeutung für die Malignität des Prostatakarzinoms ist, als die Veränderung eines einzelnen Chemokins.

Die Funktion von CXCL13 beim Prostataumor lässt sich nur spekulativ interpretieren. CXCL13-Chemokine spielen eine besondere Aufgabe bei der Lokalisation von normalen B-Lymphozyten in verschiedenen Geweben. CXCL13 ist stark exprimiert in Follikeln der

Payer'schen Plaques, in der Milz, in Lymphknoten von follikulär-dendritischen Zellen (FDC) und von benachbarten follikulären Bindegewebszellen (*Ansel et al., 2000*). CXCL13 bindet spezifisch an CXCR5, der von gereiften B-Lymphozyten und einer Subpopulation von T-Helfer-Gedächtnis-Zellen exprimiert wird (*Dobner et al., 1992*). CXCL13 ist in sekundären lymphatischen Organen exprimiert und reguliert den Metabolismus von Leukozyten und dendritischen Zellen in diesen Organen (*Cyster, 1999*). Die sekundären lymphatischen Organe sind wichtig für die Reifung und Differenzierung der Lymphozyten zu Gedächtnis und Effektor-Zellen. Homeostatische Chemokine wie CXCL12 und CXCL13 sind in der Formierung der lymphatischen Organe involviert. Manche Autoren geben auch eine synergistische Funktion zwischen CXCL12 und CXCL13 an (*Husson et al., 2002*). CXCL13 ist für die Gestaltung mancher Lymphknoten notwendig (*Ansel et al., 2000*). Die verstärkte CXCL13-Expression verursacht dabei die Bildung von ektope Lymphoidstrukturen (*Luther et al., 2003*). Auch die Migration von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe scheint über CXCL13 gesteuert zu werden. Offensichtlich trägt CXCL13 zur Steuerung immuno-inflammatorischer Prozesse bei.

Neuen Studien zufolge können CXCL13-Chemokine darüber hinaus eine Rolle in neoplastischen Transformationen und bei der Invasion von Tumorzellen durch das Kapillarendothel und der extrazellulären Matrix spielen (*Payne et al., 2002; Sharma et al., 2004; Strieter et al., 2004; Walser et al., 2004*). Arbeiten von Engl und Mitarbeiter (*2005*), in denen das Chemokine Profil in PC-3, DU-145 und LNCaP-Prostatatumorzelllinien evaluiert wurde, berichten von einer deutlichen Expression von CXCL13 in LNCaP-Zellen im Vergleich zu PC-3 und DU-145 Zellen. Basierend auf ihren Wachstumseigenschaften und ihrer Adhäsionskapazität wurden PC-3 und DU-145-Zellen als hoch und LNCaP-Zellen als niedrig aggressiv eingeordnet. Interessant ist dabei die Tatsache, dass niedrigmaligne Zellen eine erhöhte Expression, hochgradig maligne Zellen eine erniedrigte CXCL13-Expression aufweisen. Diese Befunde korrelieren mit den eigenen Ergebnissen mit reduzierter CXCL13 mRNA im Tumorgewebe. Erwähnt werden sollte, dass die untersuchten Proben unterschiedliche Konzentration an Chemokinen aufwiesen, bedingt durch eine ungleiche Menge an Karzinomzellen pro Probenmaterial. Es ist daher nicht möglich auszusagen, welche und wie viele Prostatatumorzellen mittels RT-PCR quantitativ erfasst worden sind. Da die analysierten Gewebestücke nicht nur aus reinen Karzinomherden bestanden, sondern auch andere Zellfraktionen enthielten, könnte der Chemokin-Metabolismus durchaus durch Nichtkarzinomzellen beeinflusst worden sein.

Unabhängig davon wurde jedoch zweifelsfrei eine signifikante Verminderung von CXCR5 und seinem Ligand CXCL13 festgestellt. Strieter *et al.* (1995) hatten festgestellt, dass die ELR<sup>+</sup>-CXC Chemokine potente Angiogenese-Faktoren sind, hingegen ELR<sup>-</sup>-CXC Chemokine als starke Angiostase-Faktoren agieren (Strieter *et al.*, 1995). Laut Zlotnik und Rossi (2000) binden ELR<sup>+</sup>-CXCL Chemokine an CXCR1- und CXCR2-Rezeptoren, ELR<sup>-</sup>-CXCL Chemokine an CXCR3-, CXCR4- und CXCR5-Rezeptoren (Zlotnik und Rossi, 2000). Da CXCL13 an CXCR5 koppelt, könnte sich spekulativ CXC Ligand 13 ein angiostatisches Protein verkörpern. Demzufolge wäre der angiostatische Effekt von CXCL13 im Gewebe vermindert, was konsequenterweise mit einer verstärkten Angiogenese einherginge. Diese Gegebenheit ist für die Tumorprogression entscheidend. Untermuert wird diese Hypothese durch *in vitro* Studien, nach denen die Prostatatumormalignität mit einer vermehrten Synthese von Angiogenese-stimulierenden CXC Chemokinen verbunden ist (Engl *et al.*, 2005). Vor allem Chemokine wie CXCL1, CXCL3, CXCL5 und CXCL6 sollen das Voranschreiten eines Tumors von einem niedrigen zu einem hoch aggressiven Phänotyp steuern. Jedoch können durchaus weitere CXC Liganden die Angiogenese regulieren und steuern. Vermutlich bestimmt ein ganzes Kollektiv von Chemokinen die Progression des Tumors. In diesem Sinne führte eine Störung der Produktion spezifischer Chemokine zu einem Ungleichgewicht des initialen, homeostatischen Chemokinprofils in der Zelle und dadurch bedingt zur Initiierung prokarzinogener Prozesse.

CXCL13 wird in der Literatur mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Aust *et al.* (2004) untersuchten die Rolle von CXCL13 und die Interaktion mit CXCR5 in thyreoidalen Autoimmunprozessen. Sie postulierten eine Abhängigkeit zwischen der CXCL13- und CXCR5-Expression und der Organisation von fokalen lymphozytären Infiltraten. Die Präsenz von Chemokinen ist in der Tat eng mit der Lymphozyteninfiltration verbunden (Aust *et al.*, 2004). Jedoch wird CXCL13 auch in irregulären lymphozytären Aggregaten in ulzerativen Colitisläsionen produziert und akkumuliert (Carlsen *et al.*, 2002). Eine erhöhte Expression ist auch in *Helicobacter pylori*-induzierten MALT und Magenlymphom anzutreffen (Mazzucchelli *et al.*, 1999). Nach Fujii und Mitarbeiter (2004) ist die CXCL13 Aktivität in extranodalen, nodalen und Lymphomen des peripheren Nervensystems erhöht (Fujii *et al.*, 2004). Husson und Mitarbeiter (2002) stellten eine Produktion von CXCL13 in folliculären Lymphomen fest (Husson *et al.*, 2002). Smith *et al.* (2003) dokumentierten eine CXCL13-mRNA Expression in malignen B-Zellen, aber nicht im Gefäßendothel. Sie machten CXCL13 für die Transzytose verantwortlich und postulierten, dass die CXCL13-Expression von malignen Lymphozyten und Gefäßendothel die

Lokalisation des Lymphoms in ZNS beeinflussen könne (*Smith et al., 2003*). Die malignen Lymphozyten umkreisen normalerweise die Gefäßendothelien. Da die B-Lymphozyten CXCR5 exprimieren, könnten Endothelzellen spekulativ maligne B-Lymphozyten anlocken, vorausgesetzt die Endothelzellen produzieren CXCL13. Ob diese CXCL13-Abhängigkeit auf die Prostatatumorprogression übertragbar ist, lässt sich nur vermuten. Tatsächlich bilden Tumorzellen Aggregate, die einen intensiven Kontakt mit dem Endothel eingehen. In diesem Rahmen ist ein Transfer von CXCL13 von malignen Zellen zum Gefäßendothel denkbar, der möglicherweise unmittelbar die zielgerichtete Wanderung immunkompetenter Lymphozyten in den Tumorfokus nach sich zieht. Ein Verlust an CXCL13 trüge somit direkt zum „Immune-Escape“ des Tumors bei. Gestützt wird diese These durch die nachgewiesene Assoziation von CXCL13 mit diversen Entzündungsprozessen (*Mazzucchelli et al., 1999; Carlsen et al., 2005*).

#### 4.4. Ausblick

Da Chemokine und deren Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasebildung spielen, eröffnet die pharmakologische Modulation des Chemokin-Expressionsprofils einen attraktiven Behandlungsweg zur Therapie verschiedener neoplastischer Formationen. Zahlreiche Möglichkeiten sind denkbar, den Chemokin- oder Chemokin-Rezeptor-Metabolismus zu beeinflussen.

Eine Transduktion von Tumorzellen mit Chemokingenen induziert die Unterdrückung der Tumorausbreitung. Braun *et al.* (2000) beschreiben, dass C3L5-Brustkarzinomzellen nach CCL19-Transduktion abgestoßen werden (*Braun et al., 2000*).

Die Applikation von Chemokin-Proteinen in Tumorzellen kann starke antitumorale Effekte entfalten. Vicari *et al.* (2000) haben diese Tatsache bezüglich des Chemokins CCL21 beschrieben, welches angiostatische und immunologische Mechanismen induziert. Effektiv werden auch monoklonale Antikörper gegen Chemokin-Rezeptoren als Inhibitoren des Zellwachstums maligner Zellen genutzt. In der Tat inhibieren anti-CXCR4-Antikörper die Lymphknotenmetastasierung von Brustkrebszellen in SCID Mäusen (*Muller, Horney, Soto et al., 2001*).

Eine weitere therapeutische Option verbirgt sich hinter dem Einsatz niedrigmolekularer Inhibitoren. AMD3100 ist ein Antagonist von CXCR4, der das Tumorwachstum von Gehirntumorzellen durch Apoptose verhindert (*Rubin, Kung, Klein et al., 2003*).

---

Die Chemokin-Ligand-Rezeptor-Interaktion (zum Beispiel CXCL12-CXCR4 beim Prostatakarzinom) ist bei vielen Tumorprozessen präsent. Die exakte Beschreibung typischer Chemokinveränderungen während der Tumorgenese und Progression ist somit nicht nur für die Abschätzung der Langzeitprognose von Relevanz, sondern ermöglicht auch die Etablierung spezifischer Antitumor-Protokolle. Inwieweit die Präferenz auf die Anwendung angiostatischer Chemokine zu legen ist, oder ob patientenselektiv die Wiederherstellung des ursprünglichen Chemokingleichgewichts anzustreben ist, sollte Gegenstand weiterführender Studien sein.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Zahlreiche Studien postulieren einen Einfluss löslicher Chemokine und ihrer Liganden auf die Malignität des Prostatakarzinoms. Es gibt Hinweise, dass die CXC-Untergruppe der Chemokin Familie eine besondere Rolle bei der Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms spielt. Da wenig über das Expressionsprofil der CXC Chemokine (CXCL) und ihrer korrespondierenden Rezeptoren (CXCR) beim Prostatakarzinom bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die Erstellung eines Chemokin-Profiles angestrebt. An 50 Gewebeproben wurde die Expression der CXCR und CXCL an Karzinomgewebe analysiert und jeweils mit dem Muster im tumorfreien Probenmaterial verglichen. Mittels *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) wurde dabei die Genaktivität der Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 sowie ihrer Rezeptoren CXCR1-CXCR6 ermittelt. Des Weiteren wurde durch konfokale Laserscanmikroskopie die Verteilung der CXC Rezeptoren an Prostatatumorzellen (LNCaP) evaluiert. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine veränderte Expression von sowohl CXCL als auch CXCR im Tumoreal. Als bemerkenswert ist die deutlich reduzierte Expression von CXCL13 und CXCR5 mRNA im Tumorgewebe einzuordnen. Hervorzuheben sind ferner Unterschiede im Verhältnis einzelner Chemokine zueinander. Obwohl signifikante Differenzen am Tumormaterial hinreichend belegt werden konnten, trifft dies nicht in gleichem Maße zu, wenn die ermittelten Daten in Relation zum histopathologischen Grading, der Tumorinvasivität und Gleason Score gesetzt wurden. Insgesamt lässt sich ableiten, dass die Progression des Prostatatumors mit Alterationen verschiedener CXC Chemokine einhergeht. Die Modulation eines komplexen Chemokin-Profiles ist dabei für die Tumormalignität von größerer Relevanz, als die Veränderung eines einzelnen Chemokins. Die biologische Bedeutung der veränderten Expression ist bislang unklar. Da aber das lokale Wachstum und die lokale Metastasierung des Prostatakarzinoms möglicherweise direkt über Veränderungen des Chemokin-Profiles beeinflusst werden, erlaubt die Analyse der CXCL/CXCR-Achse wichtige Schlüsse zur Prognose der Erkrankung. Auch sind innovative Therapiekonzepte denkbar, die in die Regulation der Chemokine eingreifen und so einem progredienten Krankheitsverlauf entgegensteuern.

## 5.2. Summary

Several studies postulate an influence of soluble chemokines and their receptors on prostate cancer malignancy. It is supposed that CXC-subtypes of the chemokine family play an important role in the progression and metastasis of prostate tumors. Because little is known about the expression profile of the CXC chemokines (CXCL) and corresponding receptors (CXCR) in prostate cancer, the complete chemokine profile was evaluated in the present work. Based on 50 tumor specimen, expression of CXCR and CXCL was analyzed in tumor-containing versus tumor-free tissue. Gene activity of CXCL chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 and their receptors CXCR1 - CXCR6 was measured by *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Furthermore, localization of CXCR was detected by confocal laser scanning microscopy using the prostate tumor cell line LNCaP. Compared to normal prostate tissue, distinct alterations of CXCL and CXCR became obvious in the tumor specimen. Remarkably, both CXCL13 and CXCR5 mRNAs were drastically reduced in tumor material. Calculation of the relative chemokine ratio revealed distinct alterations between tumor and normal tissue. Although significant differences were seen in cancerous tissue per se, this was not true with respect to the histopathological grading, tumor invasiveness and Gleason Score. The data provide evidence that tumor progression is correlated with CXC-alterations. In this context, the modulation of a complex chemokine profile is of greater relevance, than changes of an individual chemokine. The biological significance of the changes observed is not clear. However, local growth and metastasis might be directly influenced by CXCL and CXCR. In that case, analysis of the CXCL/CXCR axis allows to conclude to prostate cancer progression. Furthermore, novel antitumoral protocols may block tumor migration and metastasis by CXCL/CXCR regulation.

**Literaturverzeichnis**

- Alkhatib G, Liao F, Berger EA, Farber JM, and Peden KW. A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature*. 1997 Jul 17; 388(6639):238.
- Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000 Jul 20;406(6793):309-14.
- Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ et al. Interferon –  $\gamma$ - inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 1996; 1996 Sep 1; 184(3):981-92.
- Arya M, Patel HR, McGurk C, Tatoud R, Klocker H, Masters J, Williamson M. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol*. 2004 Dec;4(4):291-303.
- Aust G, Sittig D, Becherer L, Anderegg U, Schutz A, Lamesch P, Schmucking E. The role of CXCR5 and its ligand CXCL13 in the compartmentalization of lymphocytes in thyroids affected by autoimmune thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology* (2004) Feb; 150(2):225-34.
- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 2001 Aug; 250(2):91-104.
- Baggioni M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):565-8 *Nature* 1998,392: 565-68.
- Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*. 1998 Jan 1; 391(6662):86-9.



- Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 2001a Jun; 77(5):1226-36.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 2001b Jul; 22(3):147-84.
- Balkwill F, 2004. Cancer and the Chemokine Network, *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul; 4(7):540-50.
- Balkwill Fran. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol*. 2003 Feb; 15(1):49-55.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17; 357(9255):539-45.
- Balkwill F. The molecular and cellular biology of the chemokines. *J Viral Hepat*. 1998 Jan; 5(1):1-14.
- Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine Receptor CXCR 4. *Semin Cancer Biol*. 2004 Jun; 14(3):171-9.
- Bar-Eli M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology*. 1999; 67(1):12-8.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996 Aug 29; 382(6594):829-33.
- Bochner BS: Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Nov; 106(5):817-28.
- Böcker et al., Pathologie, 2001, Urban und Fischer Verlag München/Jena, 834-36.

- Bordoni R, Fine R, Murray D, Richmond A. Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, nevocytes, and malignant melanocytes. *J Cell Biochem.* 1990 Dec;44(4):207-19.
- Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P, Salmona M, Mantovani A. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science.* 1983 Apr 8; 220(4593):210-2.
- Braun SE, Chen K, Foster RG, Kim CH, Hromas R, Kaplan MH, Broxmeyer HE, Cornetta K. The CC chemokine CK beta-11/MIP-3 beta/ELC/Exodus 3 mediates tumor rejection of murine breast cancer cells through NK cells. *J Immunol.* 2000 Apr 15; 164(8):4025-31.
- Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine.* 2000 Jan; 12(1):78-85.
- Carlsen HS, Bækkevold ES, Johansen FE, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut* 2002; 51(3):364–371. *J Pathol* 2005; 207: 269–76.
- Chambers A, Groom A, Mac Donald. Desimination and Growth of cancer cells in metastasis sites, *Nature*, 2002, Vol.2:563-71.
- Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC.. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001 Apr; 10(2):243-55.
- Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol.* 1994 Dec 15; 153(12):5682-8.

- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C: Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: Differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 2000 Dec;13(6):759-69.
- Corcione A, Ottonello L, Tortolina G, Facchetti P, Airolidi I, Guglielmino R, Dadati P, Truini M, Sozzani S, Dallegri F, Pistoia V. Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Apr 19; 92(8):628-35.
- Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999 Dec 10; 286(5447):2098-102.
- Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularisation, and metastasis., *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1240-2.
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997 Jul 17; 388(6639):296-300.
- Dobner T, Wolf I, Emrich T, Lipp M. Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *Eur J Immunol*. 1992 Nov; 22(11):2795-9.
- Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues; *Mol Immunol*. 2005 May; 42(7):799-809.
- Eisenhardt A, Frey U, Tack M, Roskopf D, Lummen G, Rubben H, Siffert W. Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer. *Eur Urol*. 2005 Jan; 47(1):111-7.
- Engl T, Relja B, Blumenberg C, Muller I, Ringel EM, Beecken WD, Jonas D, Blaheta RA. Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. *Epub 2005 Nov 2. Life Sci*. 2006 Mar 13; 78(16):1784-93.

- Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg Ch, Müller I, Beecken W-D, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion via alpha5 and beta3 integrins. *Neoplasia* 2006, im Druck.
- Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2004 Jan 8;23(1):157-67.
- Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, Kreutzer DL. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology*. 1998 Jan; 51(1):161-7.
- Ferrer FA, Pantschenko AG, Miller LJ, Anderson K, Grunnet M, McKenna PH, Kreutzer D. Angiogenesis and neuroblastomas: interleukin-8 and interleukin-8 receptor expression in human neuroblastoma. *J Urol*. 2000 Sep;164(3 Pt 2):1016-20.
- Fidler, I.J. Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother. Cancer Chemother Pharmacol*. 1999; 43 Suppl: S3-10.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun; 3(6):453-8.
- Folkman, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*. 1986 Feb; 46(2):467-73.
- Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol*. 1992; 3, 65–71.
- Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*. 1994 Aug 1; 84(3):830-40.

- Fujii A, Ohshima K, Hamasaki M, Makimoto Y, Haraoka S, Utsunomiya H, Okazaki M, Kikuchi M. Differential expression of chemokines, chemokine receptors, cytokines and cytokine receptors in diffuse large B cell malignant lymphoma *Int J Oncol*. 2004 Mar;24(3):529-38.
- Fujisawa N, Sakao Y, Hayashi S, Hadden WA 3rd, Harmon CL, Miller EJ. Alpha-chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000 Jan; 126(1):19-26.
- Galligan C and Howard O. An Expanding Appreciation of the role chemokine receptors play in cancer progression. *Curr Pharm Des*. 2004; 10(19):2377-89.
- Gassen Hans Günther / Gangolf Schrimpf (Hrsg). *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor; 2.Auflage-Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 1999, S.50-51;333-47.*
- Gassmann P, Enns A, Haier J. Role of Tumor Cell Adhesion and Migration in Organ Specific Metastasis Formation. *Onkologie*. 2004 Dec; 27(6):577-82.
- Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol*. 2001Oct15; 167(8):4747-57.
- Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of Th2 polarisation by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 *2000 Mar 23; 404(6776):407-11.*
- Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13; 273(7):4282-7.
- Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002a May; 2(5):331-41.

- Hahn W and Weinberg R. Rules for Making Human Tumor Cells *N Engl J Med.* 2002b Nov 14; 347(20):1593-603.
- Hart CA, Brown M., Bagley S, Sharrard M and Clarke NW. Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process *Br J Cancer.* 2005 Feb 14; 92(3):503-12.
- Hedin KE. Chemokines: new, key players in the pathobiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002; 31(1-3):23-9
- Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem.* 2003 Jun 13; 278(24):21631-8. Epub 2003 Apr 9.
- Husson H, Freedman AS, Cardoso AA, Schultze J, Munoz O, Strola G, Kutok J, Carideo EG, De Beaumont R, Caligaris-Cappio F, Ghia P. CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells *Br J Haematol.* 2002 Nov; 119(2):492-5.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991 Sep 13; 253(5025):1278-80.
- Hu JY, Li GC, Wang WM, Zhu JG, Li YF, Zhou GH, Sun QB Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis *World J Gastroenterol.* 2002 Dec; 8(6):1067-72.
- Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY, Shong M. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan; 88(1):408-16.

- Imaizumi T, Hatakeyama M, Taima K, Ishikawa A, Yamashita K, Yoshida H, Satoh K.. Effect of double-stranded RNA on the expression of epithelial neutrophil activating peptide-78/CXCL-5 in human endothelial cells. *Inflammation*. 2004 Aug; 28(4):215-9.
- Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgenindependent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 May; 6(5):2104-19.
- Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*. 2002; 38:21-36.
- Ivarsson K, Ekerydh A, Fyhr IM, Janson PO, Brannstrom M. Upregulation of interleukin-8 and polarized epithelial expression of interleukin-8 receptor A in ovarian carcinomas. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000 Sep; 79(9):777-84.
- Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 2002; 14(2):83–92.
- Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, Takabayashi A, Yamaoka Y, Manabe T, Inaba K, Minato N, Oshima M, Taketo MM. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res*. 2004 Jun 1; 64(11):4010-7.
- Keller ET, Zhang J, Cooper CR, Smith PC, McCauley LK, Pienta KJ, Taichman RS. Prostate carcinoma skeletal metastases: crosstalk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev*. 2001; 20(3-4):333-49.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a Cytokine that represents new class of chemokine. *Science*. 1994 Nov 25; 266(5189):1395-9.
- Keshamouni VG, Arenberg DA, Reddy RC, Newstead MJ, Anthwal S, Standiford TJ. PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 2005 Mar; 7(3):294-301.

- Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS  
Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk  
for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20; 23(12):2744-53.
- Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8  
correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer  
cells implanted orthotopically in nude mice”, *Neoplasia*. 2001 Jan-Feb; 3(1):33-42.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter  
RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992  
Dec 11; 258(5089):1798-801.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi  
H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and  
CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor  
progression. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep; 6(9):3530-5.
- Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer- much  
more than direct cell movement; *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):489-96.
- Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TN.  
Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor  
binding and cellular responses. *Biochemistry*. 1999 Sep 28; 38(39):12959-68.
- Kwak MK, Hur K, Park do J, Lee HJ, Lee HS, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Yang HK  
Expression of chemokine receptors in human gastric cancer., *Tumour Biol*. 2005 Mar-  
Apr;26(2):65-70. Epub 2005 May.
- Lane WJ, Dias S, Hattori K, Heissig B, Choy M, Rabbany SY, Wood J, Moore MA, Rafii S.  
Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is  
dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4152-9.



- Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med.* 1998 Feb 16; 187(4):655-60.
- Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Mathy JA, Li R, Chan AS, Law S, Wong J, Chen X, So S. Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterology.* 2004 Aug; 127(2):457-69.
- Li F, Zhu HS, Han ZQ, Chen G, Gao QL, Jia P, Zhang AL, Xi L, Xu Q, Liao GN, Wang SX, Lu YP, Ma D. Effects of chemokine receptor and its ligand on migration of ovarian cancer cells. *Ai Zheng.* 2005 Jan; 24(1):23-7.
- Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, and Farber JM . STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV 1 *J Exp Med.* 1997 Jun 2;185(11):2015-23.
- Lippert, Lehrbuch der Anatomie, Urban und Schwarzenberg., 1996, S. 422-23.
- Loetscher M, Amara A, Oberlin E, Brass N, Legler D, Loetscher P, D'Apuzzo M, Meese E, Rousset D, Virelizier JL, Baggiolini M, Arenzana-Seisdedos F, Moser B. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr Biol.* 1997 Sep 1; 7(9):652-60.
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem.* 1994 Jan 7; 269(1):232-7.
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 1996 Sep 1; 184(3):963-9.
- Löffler Georg und Petrides Petro, Biochemie und Pathobiochemie – 6., korrigierte Aufl.- Berlin, Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer 1998; S. 228-31.

- Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 1999 Sep 15; 59(18):4681-7.
- Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997 Oct; 151(4):1105-13.
- Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2002 May 15; 62(10):2937-41.
- Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, and Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol.* 2000 Oct; 1(4):298-304.
- Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Scharli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest.* 1999 Nov; 104(10):R49-54.
- Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1998 Sep; 47(1):47-57.
- Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol.* 2004 May; 4(5):360-70.
- Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, Mutaguchi K, Yasumoto H, Dahiya R, Usui T, Kamiya K. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jul 30; 320(3):656-63.

- Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, Glass M, Wilke C, Xue YY, Sitterding S, Kunkel SL, Burdick MD, Strieter RM. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 1999 May; 154(5):1503-12.
- Moore BB, Keane MP, Addison CL, Arenberg DA, Strieter RM. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med.* 1998 Apr; 46(4):113-20.
- Mukaida N. Pathophysiological roles of Interleukin 8/CXCL 8 in pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Apr; 284(4):L566-77.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001 Mar 1; 410(6824):50-6.
- Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 2002 Dec 15; 62(24):7328-34.
- Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, Montironi R, Waugh DJ. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11) June 1, 2005 4117-127.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International Union of Pharmacology, XXII, Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Mar;52(1):145-76.
- Murphy M, International Union of Pharmacology. XXX. Update on Chemokine Receptor Nomenclature; Laboratory of Host Defenses, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):227-9.

- Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991 Sep 13; 253(5025):1280-3.
- Murphy PM: Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*. 2001 Sep 13; 345(11):833-5.
- Newton C. R. und A. Graham. PCR. Aus dem Engl. übers. von Kurt Beginnen. - Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl. 1994, S. 15-22; 77.
- Nicolson, G. L. Cancer metastasis: tumour cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Nov 15; 948(2):175-224.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996 Aug 29; 382(6594):833-5.
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2002 Nov 20; 102(3):220-4.
- Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002 Jul 1; 196(1):65-75.
- Owen JD, Strieter R, Burdick M, Haghnegahdar H, Nanney L, Shattuck-Brandt R, Richmond A. Enhanced tumour-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/ growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer*. 1997 Sep 26; 73(1):94-103.
- Payne, A.S., Cornelius, L.A., 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol*. 2002 Jun;118(6):915-22.

- Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, Fonsato V, Mitola S, Grignani G, Surrenti N, Sangiolo D, Bussolino F, Piacibello W, Aglietta M. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 15; 11(2 Pt 1):490-7.
- Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal Growth Factor and Hypoxia-induced Expression of CXC Chemokine Receptor 4 on Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2005 Jun 10; 280(23):22473-81. Epub 2005 Mar 31.
- Piali L, Weber C, LaRosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, Moser B. The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur J Immunol.* 1998 Mar; 28(3):961-72.
- Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*; 258., neu bearbeitete Auflage – Berlin: de Gruyter; 1998; S.593.
- Richards BL, Eisma RJ, Spiro JD, Lindquist RL, Kreutzer DL. Coexpression of interleukin-8 receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg.* 1997 Nov; 174(5):507-12.
- Richmond A, Thomas HG. Purification of melanoma growth stimulatory activity. *J Cell Physiol.* 1986 Dec; 129(3):375-84.
- Rollins BJ, 1997, Chemokines. *Blood.* 1997 Aug 1; 90(3):909-28.
- Rot A, von Adrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense:basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891-928.

- Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. A small – molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11; 100(23):13513-8. Epub 2003 Oct 31.
- Ruoslahti E. Specialisation of Tumor Vascularisation. *Nat Rev Cancer*. 2002 Feb; 2(2):83-90.
- Saeki H, Wu MT, Olasz E, Hwang ST. A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte chemoattractant in vitro, and co-localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo. *Eur J Immunol*. 2000 Oct; 30(10):2808-14.
- Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, Toi M. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein- 1 expression with neurovascularisation and progression of breast carcinoma *Cancer*. 2001 Sep 1; 92(5):1085-91.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis, T. *Molecular cloning – A Laboratory Manual*. 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- Schaerli, P. Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., Moser, B., 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000 Dec 4; 192(11):1553-62.
- Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2002 Oct 15; 62 (20) : 5930-8.
- Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, Vanguri P, Burd PR, Sheikh N, Gupta G, Teruya- Feldstein J, Tosato G. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26; 93(24):13791-6.

- Sharma, S., Karakousis, C.P., Takita, H., Shin, K., Brooks, S.P. Cytokines and chemokines are expressed at different levels in small and large murine colon-26 tumors following intratumoral injections of CpG ODN. *Neoplasia*. 2004 Sep-Oct; 6(5):523-8.
- Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion *Lab Invest*. 2004 Dec; 84(12):1666-76.
- Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma *J Exp Med*. 1994 May 1;179(5):1409-15.
- Smith JR, Brazier RM, Paoletti S, Lipp M, Ugucioni M, Rosenbaum JT. Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):815-21. Epub 2002 Oct 3.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties *J Immunol*. 1998 Aug 1; 161(3):1083-6.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR Motif in CXC mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10; 270(45):27348-57.
- Strieter, R.M., Belperio, J.A., Burdick, M.D., Sharma, S., Dubinett, S.M., Keane, M.P. CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec; 1028:351-60.
- Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem*. 2003 Jun 1; 89(3):462-73.

- Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, Mc-Cauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 2002 Mar 15; 62(6):1832-7.
- Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU. Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas.* 2000 Jul; 21(1):52-6.
- Tanaka T, Bai Z, Srinoulpraset Y, Yang B, Hayasaka H and Miyasaka M., Chemokines in tumor progression and metastasis, *Cancer Sci.* 2005 Jun; 96(6): 317-22.
- Trentin L, Cabrelle A, Facco M, Carollo D, Miorin M, Tosoni A, Pizzo P, Binotto G, Nicolardi L, Zambello R, Adami F, Agostini C, Semenzato G. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas *Blood.* 2004 Jul 15; 104(2): 502-8. Epub 2004 Mar 4.
- Uehara H, Troncoso P, Johnston D, Bucana CD, Dinney C, Dong Z, Fidler IJ, Pettaway CA. Expression of interleukin-8 gene in radikal prostatectomy specimenis associated with advanced pathologic stage. *Prostate.* 2005 Jun 15; 64(1): 40-9.
- Veltri RW, Miller MC, Zhao G, Ng A, Marley GM, Wright GL Jr, Vessella RL, Ralph D. Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology.* 1999 Jan; 53(1):139-47.
- Vicari AP, Ait-Yahia S, Chemin K, Mueller A, Zlotnik A, Caux C. Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol.* 2000 Aug 15; 165(4):1992-2000.
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity.* 1997 Aug; 7(2):291-301.



- Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2002 May 10; 99(2):157-66.
- Wagsater D, Dimberg J.; Expression of chemokine receptor CXCR6 in human colorectal adenocarcinomas, *Anticancer Res*. 2004 Nov-Dec; 24(6):3711-4.
- Walser, T.C., Fulton, A.M.,. The role of chemokines in the biology and therapy of breast cancer. *Breast Disease* 2004, 20: 137-143.
- Wang J, Huang M, Lee P, Komanduri K, Sharma S, Chen G, Dubinett SM. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumour growth by autocrine and paracrine pathways. *J Interferon Cytokine Res*. 1996 Jan; 16(1):53-60.
- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999 May; 13(8):781-92.
- Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, and Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC and CX3C chemokines. *J Immunol*. 2001 Apr 15; 166(8):5145-54.
- Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor -7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93 (21):1638-43.
- Wong S, Fulcher D. Chemokine Receptor Expression in B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Leukemia & Lymphoma*, December 2004 Vol. 45 (12), pp. 2491–496.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*. 1997 Oct 15; 80(8 Suppl):1529-37.

- Wu MT, Hwang ST. CXCR5-transduced bone marrow-derived dendritic cells traffic to B cell zones of lymph nodes and modify antigen-specific immune responses. *J Immunol.* 2002 May 15; 168(10):5096-102.
- Wyckoff, J. B. Jones, J. G., Condeelis, J. S. & Segall, J. E. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res.* 2000 May 1; 60(9):2504-11.
- Yamada H, Luo Y, Matsumoto T, O'Donnell MA. A novel expression of macrophage derived chemokine in human bladder cancer. *J Urol.* 2005 Mar; 173(3):990-5.
- Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW, Lira SA. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2000 Feb 7; 191(3):445-54.
- Yin JJ, Pollock C, Kelly K. Mechanism of cancer metastasis to the bone *Cell Res.* 2005 Jan; 15(1):57-62.
- Yu P, Wang Y, Chin RK, Martinez-Pomares L, Gordon S, Kosco-Vibois MH, Cyster J, Fu YX. B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-independent fashion. *J Immunol.* 2002 May 15; 168(10):5117-23.
- Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR 4 is a major chemokine receptor on glioma cell and mediates their survival. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49481-7. *Epub* 2002 Oct 17.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb; 12(2):121-7.
- Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression *Semin Cancer Biol.* 2004 Jun; 14(3):181-5.

Zlotnik A und Rossi D, The biology of Chemokines and their Receptors Annu Rev Immunol. 2000;18:217-42.

### **Internet**

Das mittlere Erkrankungsalter für Männer und Frauen bei Krebserkrankungen: Arbeitsgemeinschaft Berufbezogener Krebsregister in Deutschland, Robert Koch Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de), abgerufen 2004

Epidemiologie von Prostatakrebs: Krebstodesursache bei Männern aus Krebsatlas des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg, [www.dkfz-heidelberg.de](http://www.dkfz-heidelberg.de), abgerufen 2004

Epidemiologie von Neubildungen: Erkrankungsfälle an Prostatakrebs und Erkrankungsfälle jährlich an Neoplasien in Deutschland aus Robert Koch Institut, Dachdokumentation Krebs, [www.rki.de](http://www.rki.de), abgerufen 2004

Epidemiologie von Prostatakrebs Erkrankungsfälle an Prostatakrebs Aus Robert Koch Institut, Dachdokumentation Krebs, [www.rki.de](http://www.rki.de), abgerufen 2004

Zahl der an Neubildungen Gestorbenen im Jahre 2003 aus dem Statistischen Bundesamt, [www.destatis.de](http://www.destatis.de), abgerufen 2005

Risikofaktoren von Prostatakrebs: [www.astrazeneca.ch](http://www.astrazeneca.ch), abgerufen 2005

Tabelle 8: Darstellung des Gleason-Scores (GS): [www.prostata.de](http://www.prostata.de), 2005

Tabelle 9: Darstellung des TNM-Systems bei Prostatakarzinom: [www.prostata.de](http://www.prostata.de), 2005

## 7. Anhang

### 7.1. Verzeichnis der Abbildungen

**Abbildung 1:** Darstellung mikroskopischer Schnellschnittbilder von Prostatagewebe in 100 facher Vergrößerung; **1A:** normales Prostatagewebe, **1B:** Prostatagewebe mit Karzinomveränderungen.....S.40

**Abbildung 2 A - C:** Repräsentative Darstellung des Oberflächenverteilungsmusters der Chemokin - Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR5 bei der Prostatatumorzelllinie LNCaP mittels konfokaler Laserscanmikroskopie **A:** CXCR3-Rezeptor-Darstellung; **B:** CXCR4-Rezeptor-Darstellung; **C:** CXCR5-Rezeptor-Darstellung.....S.41-42

**Abbildung 3:** Semiquantitative Darstellung der CXCR4-, CXCR5- und CXCR6- kodierenden mRNA mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wird das house-keeping gene GAPDH verwendet.....S.44

**Abbildung 4:** Semiquantitative Darstellung der CXCL1-, CXCL2-, CXCL4-, CXCL5-, CXCL8-, CXCL9-, CXCL10-, CXCL12-, CXCL13 - kodierenden mRNA mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wird das house-keeping gene GAPDH benutzt.....S.45

**Abbildung 5:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCR4 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata..... S.47

**Abbildung 6:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCR5 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata.....S.47

**Abbildung 7:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL9 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata.....S.49

**Abbildung 8:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL10 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata.....S.49

- Abbildung 9:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL12 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata.....S.50
- Abbildung 10:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression von CXCL13 in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata.....S.51
- Abbildung 11:** Darstellung der Änderung der mRNA-Expression in Bezug auf CXCL13/CXCL10-Ratio in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata...S.51
- Abbildung 12:** Darstellung der Änderung der mRNA - Expression in Bezug auf CXCL13/CXCL 12 - Ratio in untersuchtem normalen und Karzinomgewebe der Prostata S.52
- Abbildung 13:** Darstellung der Verteilung der Zahl der untersuchten Patienten und des histopathologischen Gradings (G) des Prostatatumors..... S.53
- Abbildung 14:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben.....S.54
- Abbildung 15:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben.....S.54
- Abbildung 16:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben.....S.55
- Abbildung 17:** Darstellung der Abhängigkeit vom präoperativen PSA-Wert unter Berücksichtigung des histopathologischen Gradings (G) der Patienten in Karzinomgewebeproben .....S.56
- Abbildung 18:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeproben.....S.57

**Abbildung 19:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeprobe n .....S.57

**Abbildung 20:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeprobe n. ....S.58

**Abbildung 21:** Darstellung der Abhängigkeit vom präoperativen PSA-Wert unter Berücksichtigung der Tumorinvasivität (T) der Patienten in Karzinomgewebeprobe n.....S.59

**Abbildung 22:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR4-Banden unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeprobe n.....S.60

**Abbildung 23:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der GAPDH zu CXCR5-Banden unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeprobe n.....S. 60

**Abbildung 24:** Darstellung der Abhängigkeit der relativen Leuchtstärke der CXCL13 zu CXCL12-Banden unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeprobe n.....S.61

**Abbildung 25:** Darstellung der Abhängigkeit vom präoperativen PSA-Wert der Patienten unter Berücksichtigung des Gleason-Scores (GS) in Karzinomgewebeprobe n.....S.62

## 7.2. Verzeichnis der Tabellen

**Tabelle 1:** Die CXC-, C- und, CX3C-Chemokin-Rezeptor Familie. Mit „?“ sind die Maus Homologe aufgelistet, die nicht unbedingt dem humanen Liganden entsprechen. In Klammern sind die systemischen Namen aufgeführt, die noch nicht identifiziert worden sind. Verändert aus Zlotnik und Yoshie, 2000.....S.15

**Tabelle 2:** Übersicht von Patientendaten bei operativer Entfernung der Prostata, PSA-Wert (präoperativ), Tumorstadium (Grading; Gleason-Score), TNM - Klassifikation und Information über Resektion des Tumors der Patienten.....S.109

**Tabelle 3:** Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (Primer).....S.21

**Tabelle 4:** Verwendete Antikörper für die Immunofluoreszenz- und Konfokale Laserscanmikroskopie in den entsprechenden Konzentrationen.....S.25

**Tabelle 5:** Erwartete Fragmentlänge von CXCR4 - 6.....S.44

**Tabelle 6:** Erwartete Fragmentlänge von CXCL1 - 10.....S.46

**Tabelle 7:** Übersicht der Verteilung der Patientenzahl und der Tumorklassifikation.....S.111

**Tabelle 8:** Darstellung des Gleason-Scores.....S.112

**Tabelle 9:** Darstellung des TNM-Systems.....S.113

### 7.3. Tabellen

**Tabelle 2:** Übersicht von Patientendaten bei operativer Entfernung der Prostata, PSA-Wert (präoperativ), Tumorstadium (Grading; Gleason Score), TNM-Klassifikation und Information über die Resektion des Tumors der Patienten


| Patient   | Alter bei OP | Wert ng/ml | G    | T     | N         | M   | GS     | R  |
|-----------|--------------|------------|------|-------|-----------|-----|--------|----|
| 1. Z. K.  | 56           | 10,5       | G3   | pT3b  | pN1(1/6)  | M0  | 9(4+5) | R1 |
| 2. S. H.  | 62           | 1,66       | yG1  | ypT2a | pN0(0/15) | M0  | GS X   | R0 |
| 3. D. E.  | 65           | 10,7       | G2   | pT3b  | pN0       | M0  | 6(3+3) | R0 |
| 4. S. M.  | 70           | 7,5        | G1   | pT2a  | pNX       | pMX | 3(1+2) | R0 |
| 5. J. A.  | 76           | 3,07       | G1   | pT2a  | pN0(0/14) | M0  | 4(1+3) | R0 |
| 6. K. H.  | 76           | 5,08       | G2   | pT2a  | pN0(0/10) | M0  | 8(4+4) | R1 |
| 7. C. W.  | 74           | 5,22       | G2   | pT2c  | pN0(0/14) | M0  | 8(3+5) | R0 |
| 8. M. E.  | 60           | 17,5       | G3   | pT2c  | pN0       | M0  | 8(5+3) | R0 |
| 9. G. H.  | 70           | 0,71       | G2-3 | pT3b  | pN0       | M0  | 8(3+5) | R1 |
| 10. K. W. | 68           | 16,6       | G3   | pT3b  | pN0(0/16) | M0  | 9(4+5) | R1 |
| 11. L. N. | 55           | 2,5        | G1   | pT2a  | pN0(0/14) | M0  | 3(1+2) | R0 |

| Fortsetzung Tabelle 2 |    |       |      |      |           |     |        |     |
|-----------------------|----|-------|------|------|-----------|-----|--------|-----|
| 12. B. F.             | 70 | 0,662 | G2   | pT3a | pN0       | M0  | 5(3+2) | R1  |
| 13. C. H.             | 69 | 6,29  | G3   | pT3b | pN0(0/6)  | M0  | 8(3+5) | R1  |
| 14. H. D.             | 67 | 8,13  | G2   | pT2c | pN0(0/22) | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 15. W. E.             | 78 | 4,18  | G2   | pT2c | pN0       | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 16. W. H.             | 68 | 4,96  | G2   | pT2c | pN0       | M0  | 5(3+2) | R0  |
| 17. D. H.             | 72 | 3,76  | G2   | pT3a | pN0(0/10) | M0  | 7(3+4) | R1  |
| 18. R. K.             | 73 | 17    | G3   | pT3a | pN0       | M0  | 8(5+3) | R0  |
| 19. K. H.             | 67 | 7,79  | G2-3 | pT2a | pN0(0/5)  | M0  | 7(4+3) | R0  |
| 20. L. R.             | 69 | 4,33  | G2   | pT3a | pN0(0/6)  | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 21. R. O.             | 63 | 9,29  | G2   | pT3a | pN0(0/15) | M0  | 7(3+4) | R1  |
| 22. V. W.             | 56 | 11,6  | G2   | pT2b | pN0(0/12) | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 23. H. K.             | 62 | 4,46  | G2   | pT3a | pN0(0/11) | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 24. K. G.             | 64 | 5,34  | G2   | pT2a | pN0       | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 25. S. W.             | 66 | 5,74  | G2   | pT2a | pN0(0/22) | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 26. L. H.             | 64 | 3,93  | G2   | pT3a | pN0       | M0  | 7(3+4) | R1  |
| 27. U. M.             | 61 | 6,4   | G2   | pT3  | pN0       | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 28. W. H.             | 60 | 6,65  | G2   | pT2c | pN0(0/11) | pMx | 6(3+3) | pR0 |
| 29. Z. A.             | 68 | 2,93  | G2   | pT3a | pN0       | M0  | 7(4+3) | R0  |
| 30. K. P.             | 67 | 14,8  | G3   | pT3b | pN1(3/14) | M0  | 9(4+5) | pR0 |
| 31. D. P.             | 61 | 2,62  | G2   | pT2c | pN0       | M0  | 6(3+3) | R1  |
| 32. K. R.             | 66 | 7,63  | G3   | pT3b | pN1(1/16) | M0  | 9(4+5) | R0  |
| 33. S. R.             | 54 | 4,93  | G2   | pT2c | pN0(0/16) | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 34. E. D.             | 70 | 37,6  | G2   | pT3a | pN0(0/5)  | M0  | 7(3+4) | RO  |
| 35. R. N.             | 71 | 1,05  | G2-3 | pT3a | pN0(9/9)  | M0  | 8(5+3) | RX  |
| 36. I. A.             | 68 | 0,483 | G2   | pT2c | pN0       | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 37. L. E.             | 58 | 6,74  | G3   | pT3a | pN0(0/11) | M0  | 9(4+5) | R0  |
| 38. Q. M.             | 60 | 9,2   | G2   | pT3b | pN1       | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 39. W. F.             | 52 | 4,78  | G2   | pT2c | pN0(0/17) | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 40. H. H.             | 64 | 5,21  | G2   | pT2a | pN0(0/34) | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 41. A. M.             | 56 | 6,85  | G3   | pT3b | pN1       | M0  | 9(5+4) | R1  |
| 42. R. H.             | 73 | 1,79  | G2   | pT3a | pN0(6/6)  | M0  | 6(4+2) | R0  |
| 43. K. M.             | 63 | 6,37  | G2   | pT2a | pN0(0/8)  | M0  | 6(3+3) | R1  |
| 44. S. W.             | 62 | 3,69  | G2   | pT2c | pN0       | M0  | 7(3+4) | R0  |
| 45. R. W.             | 58 | 4,67  | GX   | pTX  | pN0(0/13) | MX  | GS X   | RX  |
| 46. E. B.             | 66 | 8,45  | G2   | pT2c | pN0(6/10) | M0  | 7(4+3) | R0  |
| 47. J. H.             | 70 | 6,16  | G2   | pT2a | pN0(9/9)  | M0  | 6(3+3) | R0  |
| 48. K. G.             | 69 | 21,7  | G3   | pT3b | pN1(2/12) | M0  | 9(4+5) | R1  |
| 49. B.                | 67 | 7,5   | G3   | pT3b | pN0(5/3)  | M0  | 9(4+5) | R0  |
| 50. R.E.              | 61 | 6,59  | G2   | pT3b | pN1(2/21) | pMx | 6(3+3) | pR0 |

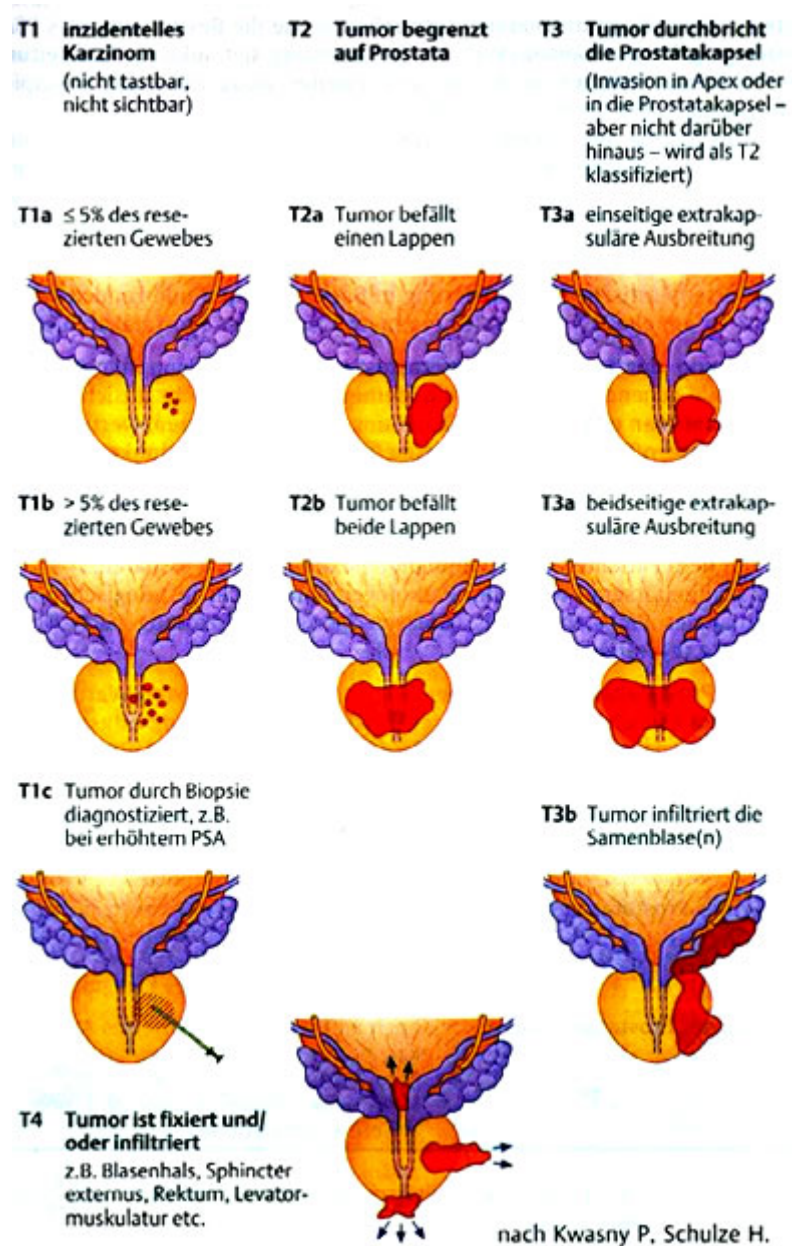


**Tabelle 7:** Übersicht der Verteilung der Patientenzahl und der Tumorklassifikation

|    | Tumorklassifikation |      |    | Zahl (50 Pat.) |
|----|---------------------|------|----|----------------|
| G  | GX                  |      |    | 1              |
|    | G1                  |      |    | 4              |
|    | G2                  |      |    | 31             |
|    | G3                  |      |    | 11             |
|    | G2-G3               |      |    | 3              |
| T  | TX                  |      |    | 1              |
|    | TO                  |      |    | 0              |
|    | T1                  | T1a  |    | 0              |
|    |                     | T1b  |    | 0              |
|    |                     | T1c  |    | 0              |
|    | T2                  | T2a  |    | 11             |
|    |                     | T2b  |    | 1              |
|    |                     | T2c  |    | 12             |
|    | T3                  |      |    | 1              |
|    |                     | T3a  |    | 12             |
|    |                     | T3b  |    | 12             |
|    |                     | T3c  |    | 0              |
|    | T4                  |      |    | 0              |
| N  | NX                  |      |    | 1              |
|    | N0                  |      |    | 42             |
|    | N1                  |      |    | 7              |
| M  | MX                  |      |    | 4              |
|    | M0                  |      |    | 46             |
|    | M1                  | M1a  |    | 0              |
|    |                     | M1b  |    | 0              |
|    |                     | M1c  |    | 0              |
| GS | GS X                |      |    | 2              |
|    | GS 2-4              | GS 3 | 2  | 3              |
|    |                     | GS 4 | 1  |                |
|    | GS 5-6              | GS 5 | 2  | 17             |
|    |                     | GS 6 | 15 |                |
|    | GS 7-10             | GS 7 | 13 |                |
|    |                     | GS 8 | 7  | 28             |
|    |                     | GS 9 | 8  |                |
| R  | RX                  |      |    | 2              |
|    | R0                  |      |    | 35             |
|    | R1                  |      |    | 13             |

**Tabelle 8:** Darstellung des Gleason-Scores (GS)


| Muster                      | 1                | 2   | 3   | 4  | 5   |
|-----------------------------|------------------|---|---|--|---|
| <b>Drüsenform</b>           | einzel,<br>rund  | einzel,<br>gerundet,<br>variabler<br>als in<br>Muster 1       | einzel,<br>unregelmäßig<br>oder<br>papilläres oder<br>kribriiformes<br>Epithel  | verschmolzene<br>glanduläre<br>Massen oder<br>„hyper-<br>nephroid“ | einige winzige<br>Drüsen oder<br>Siegelringzellen<br>oder<br>wenige kleine<br>Lumina in<br>solidem Epithel,<br>zentrale Nekrose |
| <b>Drüsengröße</b>          | mittel           | mittel  | klein,<br>mittel, groß<br>mittel<br>oder groß   | klein  | klein<br>klein  |
| <b>Drüsenabstand</b>        | dicht<br>gepackt | bis zu 1<br>Drüsen-<br>durchmesser<br>voneinander<br>getrennt | mehr als<br>1 Drüsen-<br>durchmesser<br>voneinander<br>entfernt<br>rundliche<br>Massen<br>mit glattem,<br>scharfen Rand | verschmolzen   | anaplastische<br>Epithelmassen<br>rundliche Massen<br>und Stränge mit<br>glatten, scharfen<br>Rändern                           |
| <b>Herdgrenze</b>           | scharf           | weniger<br>scharf   | schwer<br>erkennbar<br>schwer<br>erkennbar  | unscharf<br>infiltrierend  | unscharf<br>infiltrierend<br>schwer<br>erkennbar  |
| <b>Stroma-<br/>Invasion</b> | minimal          | mild  | mäßig<br>ausgedehnt   | stark  | sehr stark<br>ausgedehnt  |

**Tabelle 9:** TNM-System beim Prostatakarzinom

## 7.4. Abkürzungen

|                   |  |
|-------------------|--|
| %                 | Prozent  |
| $\alpha$          | Alpha  |
| $\beta$           | Beta   |
| $\delta$          | Delta  |
| $\gamma$          | Gamma  |
| (v/v)             | volume per volume  |
| $\mu$             | Mikro  |
| $\mu$ l           | Mikroliter   |
| Abb.              | Abbildung  |
| ABL               | Abkürzung von Onkogen  |
| Aq.               | Aqua   |
| Bp                | Basenpaare   |
| BSA               | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)                            |
| C                 | Konzentration  |
| C                 | Celsius  |
| C                 | Cystein Rest   |
| Ca                | Karzinom   |
| Ca <sup>2+</sup>  | Calcium  |
| CaCl <sub>2</sub> | Calciumchlorid   |
| cDNA              | copy Desoxyribonukleinsäure  |
| Cis               | Carcinoma in situ  |
| cm                | Centimeter   |
| CXCL              | Abkürzung für Chemokin CXC Liganden                                  |
| CXCR              | Abkürzung für Chemokin CXC Rezeptoren                                |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNAase            | Desoxyribonuklease   |
| dNTP              | Desoxynukleotid-5` - Triphosphat                                     |
| DTT               | Dithiothreitol   |
| EDTA              | Ethylendiamintetraacetat   |
| ERBB              | Abkürzung von Protoonkogen   |
| EZM               | Extrazelluläre Matrix  |
| FACS              | Fluoreszenz aktivierter Zell-Scan (fluorescence activated cell scan) |

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| FOS                | Abkürzung von Onkogen                    |
| g                  | Gramm                                    |
| G                  | Histopathologischer Grad                 |
| GAPDH              | Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase   |
| HCl                | Salzsäure                                |
| HST 1              | Abkürzung von Onkogen                    |
| INT 2              | Abkürzung von Onkogen                    |
| IU                 | Internationale Einheiten                 |
| kB                 | Kilobasen                                |
| kDa                | Kilodalton                               |
| l                  | Liter                                    |
| Ladder             | Leiter                                   |
| Ld.                | Leuchtdichte                             |
| LHRH               | luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon |
| M                  | Klassifikation der Fernmetastase         |
| m                  | männlich                                 |
| m                  | milli                                    |
| M                  | Molarität                                |
| Mg Cl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid                         |
| Min                | Minuten                                  |
| mM                 | Milimolar                                |
| mol                | Einheit der Stoffmenge                   |
| mRNA               | messenger RNA                            |
| MYB                | Abkürzung von Protoonkogen               |
| myc                | Abkürzung von Protoonkogen               |
| n                  | Anzahl                                   |
| N                  | Klassifikation für Lymphknoten           |
| Na                 | Natrium                                  |
| NaCl               | Natriumchlorid                           |
| ng                 | Nanogramm                                |
| Nm                 | Nanometer                                |
| Nr.                | Nummer                                   |
| P                  | Wert der Signifikanz                     |
| p53                | 53 kDa schweres Tumorsuppressorprotein   |

---

|        |  |
|--------|--|
| PBS    | Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)   |
| pH     | Logarithmus der Protonenkonzentration        |
| PSA    | Prostata spezifisches Antigen                |
| ras    | Abkürzung von Onkogen                        |
| RNA    | Ribonukleinsäure                             |
| RNase  | Ribonuklease                                 |
| r-RNA  | ribosomale RNA                               |
| RT     | Reverse Transkriptase                        |
| s      | Sekunde                                      |
| SIS    | Abkürzung von Onkogen                        |
| sn-RNA | small nuclear RNA                            |
| SRC    | Abkürzung von Onkogen                        |
| T      | Pathologische Klassifikation für Primärtumor |
| Tab.   | Tabelle                                      |
| Taq    | Thermophilus aquaticus                       |
| TBE    | Tris- Base- EDTA-Puffer                      |
| TNM    | TNM - Klassifikation der WHO                 |
| Tris   | Trisaminomethan                              |
| t-RNA  | transfer RNA                                 |
| U      | Units  |
| UV     | ultraviolett                                 |
| V      | Volt   |
| VEGF   | vascular endothelial growth factor           |
| w      | weiblich                                     |
| w/v    | Gewicht für Volumen (weight per volume)      |
| x      | mal  |

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist durch Unterstützung von Familie, Freunden, Mitarbeitern und Kollegen ermöglicht worden.

Herrn Prof. Dr. Dietger Jonas, Direktor der Klinik für Urologie und Kinderurologie am Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, danke ich sehr für die Überlassung des Themas und seine Hilfe.

Ausschlaggebend für meine Arbeit war die Mitarbeit des ärztlichen und nichtärztlichen Teams der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Frankfurt am Main, die die Sammlung von frischen Gewebeproben für die Untersuchungen ermöglicht haben.

Besonders möchte ich Herrn PD Dr. phil. nat. Roman Blaheta, Leiter des urologischen Forschungslabors im Zentrum der Chirurgie, danken. Er betreute mich bei der Durchführung dieser Arbeit und koordinierte die Probensammlung im Zentral-OP. Ich danke sehr für die Entwicklung der verwendeten Untersuchungsmethoden, hilfreiche Diskussionen, technische Hilfestellung bei der Durchführung der Messungen und die engmaschige Obhut der Dissertationsarbeit.

Herrn Dr. Engels, Oberarzt des Zentrums für Pathologie am Universitätsklinikum in Frankfurt am Main, danke ich für seine Unterstützung bei der Anfertigung und Überlassung von Schnellschnittbildern.

Außerdem möchte ich ganz herzlich Frau Blumenberg und Frau Müller, MTA`s im urologischen Forschungslabor der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, danken, die mir stets in Wort und Tat eine sehr große Hilfe waren. Ich danke besonders Frau Blumenberg für die persönliche Einarbeitung und sehr nette Betreuung bei der Durchführung der Versuche. Des Weiteren möchte ich meinen Dank den übrigen Mitarbeitern des Forschungslabors zur Kenntnis geben.

Ich danke besonders meiner Frau für ihre liebevolle Unterstützung und Hilfe.

Diese Arbeit wurde von vielen weiteren Personen unterstützt, die nicht persönlich erwähnt worden sind. Meinen besten Dank möchte ich Ihnen ebenso aussprechen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |   |
|---------------------|---|
| Name                | Ivaylo Nikolaev Raditchev   |
| geboren             | 24. Januar 1979   |
| in                  | Pazardzhik/Bulgarien  |
| Eltern              | Nikola Raditchev, Markscheider, Sprengmeister<br>Nikolina Raditcheva, Dipl. Ingenieur, Lehrerin |
| Geschwister         | Dessislava Raditcheva   |
| Staatsangehörigkeit | bulgarisch  |
| Familienstand       | verheiratet mit Jacqueline Raditchev  |

### Ausbildungsdaten

|            |             |  |
|------------|-------------|--|
| Schule     | 1985 - 1991 | Allgemeine Sportschule „G. Benkowski“,<br>Pazardzhik/Bulgarien                       |
|            | 1991 - 1992 | Mathematisches Gymnasium „K. Welitschkow“,<br>Pazardzhik/Bulgarien                   |
|            | 1992 - 1997 | Fremdsprachengymnasium „B. Brecht“,<br>Pazardzhik/Bulgarien                          |
| Abschluss  |             | Abitur   |
| Wehrdienst | 1998 - 1999 | Nationalarmee, Bulgarien   |
| Studium    | seit 1999   | Studium der Humanmedizin an der Johann<br>Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main |
|            | 2002        | Ärztliche Vorprüfung   |
|            | 2003        | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
|            | 2005        | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
|            | 2005        | Praktisches Jahr an der Uniklinik Frankfurt/Main                                     |
|            | 2006        | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |



Frankfurt am Main, den 08.05.06

(Unterschrift)



### **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**"Modulation des Chemokin-Profiles beim Prostatakarzinom - Neue Ansätze in Diagnostik und Therapie."**


in der Klinik für Urologie und Kinderurologie (Direktor: Prof. Dr. med. Dietger Jonas)

unter Betreuung und Anleitung von Priv.-Doz. Dr. phil. nat. Roman Blaheta

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.



Frankfurt am Main, den 08.05.06

(Unterschrift)